



UADY

FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE UNA PASTA
ANTIBIÓTICA CONTRA CEPAS BACTERIANAS
REPRESENTATIVAS DE LA MICROBIOTA DE PULPAS
NECRÓTICAS EN DIENTES TEMPORALES, *IN VITRO*.

Proyecto de tesis presentada por:
ERCILIA CASANDRA CASANOVA COCOM

En opción al Grado de:
MAESTRA EN ODONTOLOGÍA INFANTIL

Directores:
DR. VÍCTOR IRAHUEN GARCÍA PÉREZ
MOI. MARINA EDUVIGES REJÓN PERAZA

Mérida, Yucatán, Enero del 2021



UADY

FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE UNA PASTA
ANTIBIÓTICA CONTRA CEPAS BACTERIANAS
REPRESENTATIVAS DE LA MICROBIOTA DE PULPAS
NECRÓTICAS EN DIENTES TEMPORALES, *IN VITRO*.

Proyecto de tesis presentada por:
ERCILIA CASANDRA CASANOVA COCOM

En opción al Grado de:
MAESTRA EN ODONTOLOGÍA INFANTIL

Directores:
DR. VÍCTOR IRAHUEN GARCÍA PÉREZ
MOI. MARINA EDUVIGES REJÓN PERAZA

Mérida, Yucatán, Enero del 2021



Mérida, Yucatán, 4 de enero de 2021

C. ERCILIA CASANDRA CASANOVA COCOM

Con base en el dictamen emitido por sus Directores y revisores, le informo que la Tesis titulada **"Efecto antibacteriano de una pasta antibiótica contra cepas bacterianas representativas de la microbiota de pulpas necróticas en dientes temporales, *in vitro*"**, presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Título de la Maestría en Odontología Infantil, ha sido aprobada en su contenido científico, por lo tanto, se le otorga la autorización para que una vez concluidos los trámites administrativos necesarios, se le asigne la fecha y hora en la que deberá realizar su presentación y defensa.

Dr. José Rubén Herrera Atalaya
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación

García Pérez Víctor I.

Dr. Víctor Irahuen García Pérez
Director

MOI Marina Edviges Rejón Peraza
Directora

M. en Inv. En S. David Alejandro Aguilar Pérez
Revisor

M. en Inv. En S. Martha Gabriela Chuc Gamboa
Revisora

Ji

Artículo 78 del reglamento interno de la
Facultad de Odontología de la
Universidad Autónoma de Yucatán

Aunque una tesis hubiera servido para
el examen profesional y hubiera sido
aprobada por el sínodo, solo su autor o
autores son responsables de las
doctrinas en ella emitidas.

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI de la Universidad Autónoma Nacional de México, haciendo uso de sus instalaciones, material y equipos. Bajo la dirección del Dr. Víctor Irahuen García Pérez. Los resultados presentados son parte del proyecto de investigación “Efecto antibacteriano de una pasta antibiótica contra cepas bacterianas representativas de la microbiota de pulpas necróticas en dientes temporales, *in vitro*.”

INDICE

RESUMEN	
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
JUSTIFICACIÓN	24
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la patología pulpar	9
Tabla 2. Clasificación de la patología periapical	9

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación del biofilm	6
Figura 2. Preparación de Agar	37
Figura 3. Hemina, Sangre de carnero desfibrinada y placa Petri final	38
Figura 4. Caja de Cepas Bacterianas	39
Figura 5. Caja de Cepas Bacterianas	39
Figura 6. Preparación de la suspensión bacteriana	40
Figura 7. Práctica de preparación de pozos	41
Figura 8. Inoculación de placa Petri	42
Figura 9. Balanza electrónica con CTZ	43
Figura 10. Cámara de anaerobiosis	44
Figura 11. Medición de Halo y software aCOLyte 3 HD	44

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad en nuestro país existe un alto índice de niños que padecen la enfermedad conocida como caries dental, esta infección conforme avanza va aumentando la destrucción del tejido pulpar pasando de un estado de inflamación pulpar (pulpitis), seguido a la muerte de la misma (necrosis pulpar), por lo cual es necesario estar al tanto los diversos tratamientos se pueden realizar para resolver y garantizar una longevidad al órgano dentario afectado.

La pulpectomía es un tratamiento que se realiza dentro de los conductos radiculares en el cual se elimina la pulpa infectada o necrótica debido a caries o trauma, y su principal objetivo es mantener la integridad, salud y función del órgano dentario, así como también de sus tejidos de soporte. Este procedimiento está indicado en la dentición temporal y es importante porque no solo ayuda a mantener y conservar el espacio de los dientes permanentes, sino que además ayuda al desarrollo de la fonación, alimentación, respiración y armonía del paciente pediátrico.

Hoy en día existen diversos materiales que podemos utilizar para el tratamiento de pulpectomía. Dicho tratamiento se divide en instrumentada y no instrumentada; en la primera podemos utilizar materiales que tengan como requisito la reabsorción a un ritmo similar a la raíz del diente deciduo y no debe dañar los tejidos periapicales ni al germen del diente permanente, debe reabsorberse con facilidad si el material se proyecta más allá del ápice, radiopaco, antiséptico, adherirse a las paredes de los conductos y no contraerse.

En la pulpectomía no instrumentada podemos trabajar con pastas antibióticas, esta técnica es mínimamente invasiva y no amerita el limado ni ensanchado de los conductos, permitiendo un procedimiento rápido para pacientes poco cooperadores y en una sola cita. Se presume que este material tiene una capacidad antimicrobiana debido a la combinación de antibióticos presentes en su composición, los cuales son Tetraciclina y Cloranfenicol, aunados a demás componentes como Óxido de Zinc y Eugenol.

Actualmente no se cuenta con suficientes estudios *in vitro* acerca del resultado antibacterial del CTZ en los pacientes pediátricos, por lo cual nos dimos la tarea de realizar un proyecto de investigación titulado: “Efecto antibacteriano de una pasta antibiótica contra cepas bacterianas representativas de la microbiota de pulpas necróticas en dientes temporales. *in vitro*”

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La cavidad oral está colonizada por más de 700 especies de microorganismos, el 35% de las cuales son aún no cultivables. Dicha comunidad microbiana puede diferir entre la infancia y la edad adulta (1).

El papel principal de los microorganismos en la patogenia de las alteraciones pulpares y periapicales es bien conocido. Tras la exposición a la pulpa como resultado de la caries, los microorganismos que inicialmente ocupan la cámara pulpar y el lumen del conducto radicular invadiendo todo el sistema del conducto radicular e infectando los tejidos periapicales, conduciendo así al desarrollo de la periodontitis apical.

La infección extrarradicular es inaccesible para la preparación biomecánica del conducto radicular y permite la persistencia y multiplicación de microorganismos. Esto explica la aparición de una segunda infección después de un tratamiento del canal radicular.

Otro factor clave que explica la persistencia de las infecciones periapicales es la presencia de una matriz gelatinosa o una matriz extracelular que protege a los microorganismos y ayuda a su organización como biopelícula, constituyendo una barrera mecánica contra la acción de las sustancias antimicrobianas y el mecanismo de defensa del huésped (2).

BIOFILM

La caries dental es un trastorno progresivo caracterizado por la desmineralización de los tejidos dentales asociados con la disbiosis de la microbiota colonizadora (3). Esta enfermedad presenta una etiología compleja, que incluye factores genéticos, microbianos, ambientales y de comportamiento. En los niños se le conoce como caries de la infancia temprana y esta condición es una de las enfermedades dependientes de la biopelícula más frecuentes en todo el mundo (4).

Esta biopelícula está compuesta por comunidades microbianas que están estructuralmente organizadas por una matriz, la cual se va a considerar un ecosistema dinámico y complejo, y que su papel tanto en la aparición y progresión de la caries será incuestionable. La capacidad de sus comunidades microbianas se basará en la producción de ácidos en momentos en los que el pH disminuya a 5.5, este fenómeno se denomina “valor crítico de pH” (5).

Se indica que más del 60% de las infecciones bucales son a causa de los microorganismos existentes en el biofilm, el aumento de la resistencia de esta población de células a los antimicrobianos involucra varios mecanismos, entre los que se incluyen: inactivación de los antibióticos por polímeros extracelulares, disminución de la tasa de crecimiento por restricción de nutrientes y cambios fenotípicos en las células bacterianas, como resultado de la adquisición de genes de resistencia dentro de la biopelícula. El pronóstico para el tratamiento y la erradicación de las biopelículas no es el mejor. El desarrollo de nuevos medicamentos es necesario y urgente para contrarrestar las infecciones en las que la biopelícula está involucrada (6).

Streptococcus mutans ha sido identificado como un importante patógeno microbiano en el desarrollo de la caries infantil temprana, sin embargo, no todos los niños con caries de la infancia temprana albergan esta bacteria. Por lo tanto, esta asociación no es aceptada en su totalidad, ya que el microbiota asociada a la caries dental es compleja y múltiples miembros de la comunidad microbiana pueden estar implicados en el desarrollo de esta enfermedad. Más allá de *S. mutans*, los estudios de la caries de la infancia temprana han detectado otros patógenos como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Actinomyces*. Todos estos microorganismos son productores potenciales de ácido y pueden sobrevivir en un ambiente de valor crítico del pH (7).

1. BIOFILM INTERRADICULAR

El biofilm interradicular es una biopelícula formada en la dentina del conducto radicular del diente afectado. Las bacterias pueden presentarse de manera aislada como células planctónicas; esto quiere decir que pueden separarse unas de otras y suspenderse en la fase líquida del conducto o bien, pueden formar aglomeraciones bacterianas y formar una estructura empalizada, similar a la placa dental vista en la superficie del diente, teniendo una matriz extracelular de origen bacteriano y presentándose en un conjunto de filamentos, espiroquetas, cocos y varillas (8).

Los microorganismos que viven en la misma comunidad deben tener las siguientes características: autopoiesis (capacidad de autoorganizarse), homeostasis (resistencia a las alteraciones del entorno en que viven), sinergia (que es más efectiva en grupos que aislada) y capacidad de responder a los cambios como una unidad y no como individuos (9).

El biofilm es un tema de investigación en expansión, ya que involucra ecosistemas humanos, industriales y ambientales. Por lo tanto, en odontología es un desafío evaluar las expresiones de virulencia en modelos *in vivo* e *in vitro* de microambientes que se asemejan a la condición de la vida real en el conducto radicular. Además, comprender la biopelícula va a desempeñar un papel clave para ayudarnos a evaluar y comprender no sólo el potencial patogénico, sino también la base de nuevos enfoques para el control de infecciones (10).

2. FORMACIÓN DEL BIOFILM

Durante el desarrollo posnatal, los cambios fisiológicos, como la erupción de los dientes primarios y el recambio de la dentición primaria a la permanente, trastornan en gran medida los hábitats microbianos, los cuales, a su vez, pueden dar lugar a permutaciones en la composición de la colectividad microbiana en las diferentes fases de la vida de las personas. La estructura genética microbiana varía con el envejecimiento, por lo que la microbiota oral debe ser definida con base a la edad y nichos orales (11).

La microbiota adquiere un papel primordial en la inducción, la formación y la función del sistema inmune del huésped. Cuando marcha de forma óptima esta alianza el sistema inmune-microbiota permite estimulación de respuestas protectoras a los patógenos y las vías de regulación implicados en el mantenimiento de la tolerancia a antígenos inocuos (11).

La formación de la biopelícula va a iniciar inmediatamente después de la limpieza de la superficie dental, el esmalte se va a cubrir inmediatamente con una capa de proteínas salivares adquiriendo el nombre de “película salivar”, la cual tendrá múltiples micrómetros de espesor. Estas proteínas que en su mayoría serán fosforiladas van a permitir que la adherencia bacteriana permanezca unida a la superficie dental a pesar del flujo mecánico salivar, los movimientos de la lengua y la ingesta de agua (12).

Los microorganismos pioneros se asientan en la película formando colonias, primero es colonizada por bacterias aerobias grampositivas (principalmente cocos) y 2 a 4 días después se ve afectada por bacilos y filamentos grampositivos, organismos anaerobios gramnegativos (coco y filamentos) y fusiformes. Este cambio hacia organismos anaerobios hace que aumente en gran medida la patogenicidad de la biopelícula.

En las etapas finales de maduración de la placa, aparecerán formas espirales y espiroquetas, y la placa estará compuesta principalmente de organismos filamentosos. Estas colonias se agregan en una biopelícula de placa cohesiva (13).

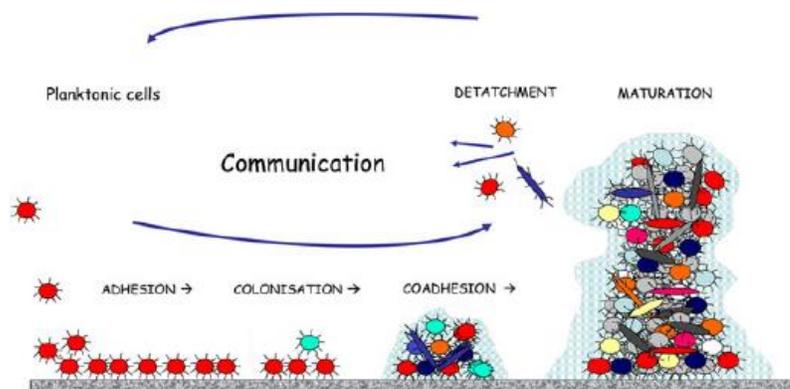


Fig 1. Formación del Biofilm

1.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL BIOFLIM

Están estructuradas, principalmente, por grandes colonias de bacterias sésiles, incrustadas en una matriz polimérica extracelular o glicocálix. La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura, y llega a representar hasta el 97 %. Está constituida por exopolisacáridos, que constituyen su componente fundamental, producidos por los microorganismos integrantes. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos y diversos productos procedentes de la lisis bacteriana.

El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas se conocen con el nombre de sustancias poliméricas extracelulares. En la matriz también pueden hallarse: cristales de sales minerales, partículas de corrosión, de sedimento o ambas, o componentes sanguíneos estando asociados con iones metálicos y cationes bivalentes, presentando una carga neutra o polianiónica, según el tipo de exopolisacárido, lo que les permitirá interactuar con distintos antimicrobianos, de forma tal que estos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias.

La arquitectura de la matriz no es sólida. Los microorganismos viven en torres celulares, que se extienden en forma tridimensional desde la superficie a la cual están adheridas. Estas torres están compuestas por microcolonias de diferentes células bacterianas, tanto aeróbicas como anaeróbicas, englobadas por exopolisacáridos y separadas unas de otras por espacios intersticiales huecos, llamados canales de agua; estos permiten el flujo de líquido y actúan como un sistema circulatorio primitivo para el transporte y difusión de nutrientes y oxígeno a las bacterias ubicadas en su interior, incluso a aquellas situadas en las zonas más profundas de la biopelícula. Asimismo, constituyen un mecanismo para la remoción de desechos metabólicos (14).

ENFERMEDAD PULPAR

La enfermedad pulpar es la reacción de la pulpa ante un irritante, en la que primeramente se adapta y en medida de la necesidad se enfrenta, organizándose para solucionar favorablemente la lesión leve o disfunción ocurrida por el ataque de los microorganismos. Si esta lesión es grave (como herida pulpar o caries muy profunda) la reacción pulpar es más violenta y al no poder adaptarse a la nueva situación, pretende al menos una resistencia larga y pasiva hacia la cronicidad; si no lo consigue, se produce una rápida necrosis. Para la enfermedad pulpar, se han preconizado diversas y diferentes clasificaciones por distintos autores, casi todas eran clasificaciones histopatológicas, que no son prácticas para la aplicación clínica y el establecimiento de una terapéutica racional (15).

En los pacientes jóvenes, el diagnóstico de una enfermedad pulpar o periapical se torna arduo, ya que con frecuencia no se pueden precisar o correlacionar con precisión los síntomas clínicos. Esto se debe a la presencia de ápices abiertos (16).

Se han preconizado muchas y distintas clasificaciones por distintos autores para las patologías pulpar y periapical, pero, como afirma Lasala, casi todas eran clasificaciones histopatológicas, que no son prácticas para la aplicación clínica y el establecimiento de una terapéutica racional (17) Cohen y Burns opinan que desde una visión más global, la pulpa se clasifica fundamentalmente como enferma o sana y, atendiendo a criterios de tratamiento adecuados, debe decidirse si ha de extirparse o no. Se establece otra clasificación siguiendo a Pumarola y Canalda, basada en la de Walton y Torabinejad, en la que se diferencia entre pulpitis, necrosis y procesos degenerativos pulpares y los procesos patológicos periapicales (15).

Tabla 1. Clasificación de la patología pulpar

PULPITIS	REVERSIBLES	HIPERSENSIBILIDAD		
		HERIDA PULPAR (Iatrogénica)		
	IRREVERSIBLES	SINTOMÁTICAS	SEROSA	
			PURULENTA	
		ASINTOMÁTICAS	HIPERPLÁSICA (Pólipo pulpar)	
		ULCERADA		
NECROSIS	PARCIAL	ASÉPTICA		
		SÉPTICA		
	TOTAL	ASÉPTICA		
		SÉPTICA		
DEGENERACIONES PULPARES	ATRÓFICA			
	CALCIFICACIÓN			
	REABSORCIÓN DENTINARIA INTERNA			
	OTRAS	GRASA		
		HIALINA		
FIBROSA				
METAPLASIA				

Tabla 2. Clasificación de la patología periapical

Periodontitis Apical Reversible	HIPEREMIA APICAL	
Periodontitis	Sintomática	Serosa
		PURULENTA
Apical irreversible	Asintomática	GRANULOMATOSA
		SUPURADA
		OSTEOESCLEROSIS APICAL

Una de las primeras causas de urgencias en las clínicas estomatológicas se debe a enfermedades pulpares y periapicales, pues a pesar de las medidas profilácticas preventivas y curativas en función de la caries dental, esta sigue siendo la enfermedad que se encuentra más diseminada en los seres humanos con una prevalencia promedio de 90%. Su comportamiento varía entre los países e influye el estilo de vida, el medio y el sistema de salud, siendo de vital importancia la vigilancia epidemiológica de la caries, dada su fuerte asociación con este tipo de urgencias (18).

3. NECROSIS PULPAR

Debe sospecharse de una pulpa necrótica cuando el diente no responde a las pruebas de sensibilidad pulpar. Sin embargo, esto no siempre será el caso, ya que los dientes con calcificación del canal pulpar, tratamiento endodóntico previo o con pulpotomías tampoco responderán a las pruebas de sensibilidad pulpar. Del mismo modo, algunos dientes o pacientes simplemente no responden a tales pruebas sin razón aparente. Cuando hay necrosis pulpar, la historia puede revelar traumas pasados, episodios previos de dolor o antecedentes de restauraciones y caries (19).

Las lesiones traumáticas en la dentición primaria pueden tener un impacto en el estado de vitalidad de la pulpa. La decoloración de la corona puede indicar cambios internos en el canal pulpar. Los colores amarillo y grisáceo son las secuelas más frecuentes de lesiones traumáticas. Las radiografías periapicales ayudarán al diagnóstico y la determinación del tratamiento si es necesario (20).

Los dientes diagnosticados con obliteración del canal pulpar (amarillentos) son vitales y deben ser monitoreados periódicamente. Los dientes con decoloración gris claro / oscuro pueden o no ser necróticos. Si es asintomático sin signos de tejido blando y / o patología periapical, los dientes solo deben ser monitoreados. La presencia de un tracto sinusal en combinación con la decoloración grisácea del diente es un patognomónico de la necrosis de la pulpa (20).

4. NECRÓSIS ASÉPTICA

Se refiere a aquella muerte de la pulpa dentaria sin presencia o afección de microorganismos. Esta pulpa dentaria perdió paulatinamente su vitalidad y terminó degenerándose, se dice que cuando esta acción ocurre, en la mayoría de los casos se encuentra íntimamente relacionada a incidentes de índole traumático y por lo general los dientes más afectados son los dientes anteriores.

A diferencia de la zona anterior que se caracteriza por la muerte pulpar infectada por varios microorganismos, la segunda causa son los órganos dentarios que presentan cavidades amplias carentes de restauraciones o con presencia de procesos cariogénicos extensos y expuestos por periodos prolongados, por lo tanto, el tiempo es un factor predisponente que permite la colonización y reproducción bactericida a gran escala (21).

5. NECROSIS SÉPTICA

Se refiere a aquella muerte de la pulpa dentaria sin presencia o afección de microorganismos, es producida por traumatismos que generan la ruptura del paquete vasculo-nervioso a nivel del foramen apical. El tiempo es un factor predisponente que permite la colonización y reproducción bactericida a gran escala.

MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA

A diferencia de otros sitios en el ecosistema oral, los conductos radiculares de los órganos dentarios son compartimentos estériles naturales que contienen tejido de la pulpa dental saludable, esta pulpa es un tejido conectivo altamente vascularizado e innervado que se extienden de la corona hasta el ápice del diente. Una vez que las bacterias invaden el espacio del conducto radicular, se encuentran con entorno altamente controlado y afectado principalmente por la presencia de mediadores de inflamación activos. Después de derrotar esta barrera inflamatoria pulpar, se presentan cambios ambientales que limitarán el crecimiento de una especie en relación con otras (22).

Los microorganismos, en particular las bacterias Gram negativas, predominantemente anaerobias, pueden colonizar inicialmente el tejido de la pulpa dental

ocasionando una infección primaria, si el tratamiento endodóntico fracasa y existe una presencia residual de bacterias, se le denominará infección secundaria (23).

Con base de los resultados de estudios previos, las comunidades microbianas en las infecciones endodónticas primarias son más diversas que las de las infecciones endodónticas secundarias, *Veillonella parvula* (20.6%) fueron encontradas con mayor frecuencia en la infección primaria, seguida por *Porphyromona gingivalis* (14.1%) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (9.2%). *Enterococcus faecalis* (36.6%) era el microorganismo más predominante en las infecciones secundarias, seguido de *Candida albicans* (20%), *Propionibacterium acnes* (2%) y *V. parvula* (2%) (23).

La terapia endodóntica debe tratar los conductos radiculares infectados, estos conductos son un sistema muy complejo el cual incluye canales laterales, ramificaciones apicales y un istmo, lo cual puede ser difícil de alcanzar con la terapia endodóntica, ya que las bacterias se propagan y pueden no verse afectadas a los procedimientos de irrigación y limado. Entender la composición de la microbiota es esencial para mejorar las estrategias de tratamiento; controlando las infecciones y eliminando los agentes patógenos para prevenir reinfecciones y lesiones periapicales (24).

6. MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA SEGÚN SU LOCALIZACIÓN ANATÓMICA

Las infecciones endodónticas se clasifican de acuerdo con la localización anatómica en infecciones intrarradiculares y extrarradiculares. A su vez las intrarradiculares se subdividen en tres categorías según el momento en que los microorganismos colonizan el conducto radicular: primaria, secundaria y persistente.

6.1 Infecciones intrarradiculares primarias: Los microorganismos que invaden y colonizan inicialmente el tejido pulpar provocan una infección intrarradicular primaria, inicial o virgen. Estas bacterias provocan una inflamación o necrosis pulpar y son caracterizadas por un consorcio mixto notablemente dominado por bacterias anaerobias y compuesto por 10 a 30 especies por canal radicular (25).

6.2 Infecciones intrarradiculares secundarias: Estas infecciones son causadas por microorganismos que no estaban presentes en la infección primaria y que han penetrado en el sistema de conducto radicular durante el tratamiento, entre citas o después de la consumación de la endodoncia debido a un incorrecto sellado coronal. Si estos microorganismos penetrantes logran sobrevivir y colonizar el sistema del conducto radicular, se establece una infección secundaria (26).

6.3 Infecciones intrarradiculares persistentes: Es causada por bacterias presentes en el momento del primer tratamiento que no se eliminaron ni se controlaron con éxito debido a una resistencia las fases de preparación químico-mecánica y la fase de medicación intraconducto. La infección persistente es la causa principal de la periodontitis apical persistente después del tratamiento, ya que estos microorganismos son capaces de tolerar un habitat escaso de nutrientes, dándoles la oportunidad de recolonizar el conducto radicular (27).

6.4 Infección Extrarradicular: Estas infecciones también pueden ser primarias, secundarias o persistentes. La biopelícula extrarradicular apical es un fenómeno clínico importante porque puede ser inherentemente resistente a los agentes antimicrobianos y su ubicación hace que sea difícil de eliminar mediante preparación biomecánica. Se dice que puede ser consecuencia o no de una infección intrarradicular previa y su forma más común de infección es el absceso perirradicular agudo (28).

7. MICROBIOLOGÍA DE LOS CONDUCTOS RADICULARES NECRÓTICOS

La mayor carga microbiana en estos casos puede deberse a la presencia de material orgánico en los túbulos dentinarios, que actúa como sustrato para las bacterias. Por lo tanto, las bacterias pueden llegar a la pulpa dental e inducir un proceso inflamatorio de magnitud variable que depende del tiempo y la intensidad del estímulo. La respuesta pulpar incluye la activación del complemento y la movilización y la acción del sistema inmune y la acción de los leucocitos fagocíticos. Estas reacciones afectan negativamente la capacidad de defensa del huésped para responder al desafío microbiano y, dado que el

tejido pulpar está rodeado de tejido duro, puede conducir a una degeneración pulpar irreversible y necrosis pulpar (29).

El tratamiento endodóntico de los dientes primarios con pulpa necrótica es habitual en la práctica dental. El control de la infección es fundamental porque los amplios espacios óseos medulares favorecen la diseminación de la infección y también porque el germe dental permanente en desarrollo está muy cerca de las raíces de los dientes primarios. Por lo tanto, es fundamental que el dentista esté al tanto del microbiota en estos dientes para que se puedan usar agentes antimicrobianos adecuados para eliminar estos patógenos. (30)

Diversos estudios han demostrado que la infección endodóntica es polimicrobial y que en la pulpa necrótica está representada por anaerobios obligatorios y facultativos, bacterias microaerófilas y hongos. A pesar de que los anaerobios obligatorios, en particular los gramnegativos pigmentados de negro producen signos y síntomas, los aerobios y anaerobios facultativos, como *Enterococcus*, *Candida* y alfa *Streptococcus*, (aunque en baja proporción) se consideran una de las especies más resistentes y la posible causa de fracaso en los tratamientos de conductos radiculares (31).

Durante las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado que las bacterias anaerobias más comúnmente aisladas de las infecciones endodónticas se pueden clasificar en dos grupos principales, cocos anaerobios grampositivos, como *Peptostreptococcus anaerobius* y *Peptostreptococcus micros*; y bacilos anaerobios gramnegativos, como *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum* y *Fusobacterium necrophorum* (32).

Las bacterias gramnegativas que se encuentran en los conductos radiculares de los dientes primarios con periodontitis apical son similares a las que se encuentran en los dientes permanentes (es decir, *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. gingivalis*, *C. ochracea*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* spp. *nucleatum*). Los hallazgos actuales también concuerdan con los de un estudio previo que muestra bacterias Gram-negativas similares (*F. nucleatum* spp. *nucleatum*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens* y *P. intermedia*) en los

conductos radiculares de los dientes primarios con necrosis pulpar y lesiones periapicales (33).

Por esta razón, este proyecto de investigación se avocará en analizar la respuesta antibacteriana de dichas cepas microbiológicas representativas del microbiota de pulpas necróticas en dientes temporales al tener contacto con el material CTZ:

Fusobacterium nucleatum

Enterococcus faecalis

Porphyromona gingivalis

Prevotella intermedia

7.1 *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum es un residente común de la microbiota orofaríngea en humanos, y es un patógeno en las enfermedades periodontales. De los anaerobios orales, es también el que más probabilidades tiene de causar infecciones extraorales. Sus infecciones metastásicas pueden implicar al cerebro, hígado, articulaciones, y las válvulas del corazón (34).

Está implicado en varias formas de enfermedades periodontales, incluida la forma reversible leve de gingivitis y las formas irreversibles avanzadas de periodontitis, incluida la periodontitis crónica, la periodontitis agresiva localizada y la periodontitis agresiva generalizada. También se asocia frecuentemente con infecciones endodónticas como la necrosis pulpar y la periodontitis periapical (35).

La capacidad de *F. nucleatum* para adherirse a las células epiteliales es un factor importante para su colonización. La capacidad de invasión de algunas bacterias permite a los patógenos no solamente evadir el sistema inmune sino invadir e infiltrarse en tejidos más profundos. *F. nucleatum* ha demostrado ser altamente invasivo y su actividad es comparable con la de *P. gingivalis* y la estimulación que provoca en la producción de IL-8 (una citoquina proinflamatoria que atrae y activa a los neutrófilos) y es 10 veces más duradera que la producida por *E. coli* (34).

7.2 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis es una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa, normalmente la encontramos en el tracto gastrointestinal, en el tracto genitourinario de la mujer, así como en la cavidad oral. Fabricius *et al.* evaluaron la capacidad de 11 bacterias para inducir reacciones periapicales en combinaciones variadas y se observó que *E. Faecalis* sobrevivió durante 6 meses en las nueve raíces inoculadas en monos como cultivos puros; incluso, esta bacteria pudo inducir una inflamación periapical leve (36).

Dos posibles causas surgen al analizar las causas que conducen a encontrar esta bacteria en los dientes que requieren un tratamiento endodóntico secundario. El primero indica que *Enterococcus faecalis* posee la capacidad de colonizar e infectar los túbulos de la dentina, este hecho complica su eliminación a través de la limpieza química y mecánica, dado el pequeño diámetro de estas estructuras anatómicas junto con la capacidad exhibida por estas bacterias para unirse al colágeno. La segunda causa es la resistencia potencial que estas bacterias pueden tener contra el hidróxido de calcio (pH alcalino), que es la medicación antibacteriana más comúnmente utilizada dentro del sistema de conducto radicular durante la terapia endodóntica, lo que permitiría que estos microorganismos permanezcan en estado de reposo (37).

7.3 *Porphyromona gingivalis*

Porphyromona gingivalis, un anaerobio gramnegativo, es uno de los principales patógenos asociados con la periodontitis crónica, una enfermedad que causa la destrucción del hueso alveolar y, como consecuencia, la pérdida de dientes. La evidencia reciente sugiere que esta bacteria contribuye a la periodontitis al funcionar como un patógeno clave (38).

P. gingivalis puede permanecer latente durante largos períodos de tiempo antes y después de expresar patogenicidad a través de la manipulación de la respuesta del huésped e interrumpe la homeostasis. Este microorganismo induce respuesta humoral y celular en el huésped; sus mecanismos de evasión y factores de virulencia demuestran que la destrucción del tejido es consecuencia de la persistente respuesta inmuno-inflamatoria. La respuesta inmune frente a *P. gingivalis* perpetua el estado inflamatorio al interferir con los mecanismos de producción de citoquinas y muerte celular en las células del huésped, lo que resulta finalmente en la destrucción del tejido (39).

7.4 *Prevotella intermedia*

Prevotella intermedia es anaeróbica gramnegativa frecuentemente observada en biopelículas polimicrobianas subgingivales, una de las causas de la periodontitis crónica y se informó que está asociada con periodontitis periapical. Esta bacteria también se ha detectado en asociación con otras afecciones orales, incluidas las infecciones endodónticas, la ulceración necrosante aguda y la gingivitis del embarazo (40).

Además, otros han implicado que *P. intermedia* está estrechamente relacionada con enfermedades sistémicas, como la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares y los accidentes cerebrovasculares, así como con el parto prematuro. Debido a su naturaleza versátil, las especies de *P. intermedia* también se han observado en el tracto respiratorio superior, el tracto urogenital y el intestino grueso (41).

8 TERAPIA PULPAR

El objetivo principal de los tratamientos pulpares en dentición temporal es mantener la integridad y la salud de los tejidos orales. Ha sido un reto poder mantener la vitalidad de la pulpa de los dientes afectados por caries o traumatismos. Sin embargo, un diente puede seguir siendo funcional eliminando la pulpa parcial o totalmente.

Las indicaciones, objetivos y el tratamiento pulpar indicado se basan en un diagnóstico clínico que determine el estado de la pulpa. Un examen preoperatorio completo es esencial para obtener un diagnóstico correcto y poder establecer el tratamiento adecuado, así como orientar en el pronóstico de éste. Este examen debe incluir una completa historia médica y dental, con especial interés en las características del dolor, una exploración clínica y radiológica, con las pruebas complementarias necesarias como la palpación, percusión y evaluación de la movilidad; sin olvidar la exploración directa pulpar que permitirá confirmar nuestro diagnóstico. Las pruebas de vitalidad térmica o

eléctrica, actualmente, tienen valor en la dentición permanente, aunque no en la dentición primaria por la regresión del tejido pulpar al exfoliarse.

Una vez realizada la historia clínica y las exploraciones clínicas necesarias, y con ayuda de nuestro juicio clínico, estableceremos el diagnóstico que, finalmente, determinará el tratamiento más adecuado (42).

8.1 PULPECTOMÍA

La pulpectomía es el curso del tratamiento que consiste en usar a menudo pacientes que presentan síntomas de pulpitis irreversible o necrosis de la pulpa con o sin inflamación, dado que es imposible para el médico determinar con precisión la extensión apical de la patosis pulpar; una pulpectomía ofrece la ventaja de la extirpación completa de la pulpa.

La pulpectomía es un tratamiento estresante para los niños y se complica debido a sus complejidades anatómicas que no se encuentran en los dientes permanentes, como por ejemplo las paredes delgadas en dentición temporal, la cuál puede ser propicia a fracturas si existiera un limado exagerado. Las pautas de la Asociación Americana de Odontología Pediátrica establecen que la pulpectomía está indicada en dientes primarios con exposiciones a la pulpa cariosa, en la cual, después de la amputación de la pulpa coronal, la pulpa radicular presenta signos clínicos de hiperemia o necrosis de la pulpa radicular con o sin afectación de caries (43).

8.1.1 NECROPULPECTOMÍA I

En los casos de dientes deciduos con necrosis pulpar sin lesión periapical, los microorganismos, predominantemente aeróbicos, están localizados en el haz del canal principal, estando el muñón pulpar y el sistema de canales radiculares sin contaminación microbiana. La técnica de tratamiento indicada en esos casos es la Necropulpectomía I, cuyos pasos operativos son semejantes a los descritos para la Biopulpectomía, excepto por

la necesidad de neutralización de contenido séptico/tóxico (necrótico) de los canales radiculares, antes de la instrumentación, para evitar la extrusión de contenido necrótico a la región principal.

Dicha neutralización debe de ser progresiva, en sentido de la corona al ápice sin presión, por medio de la limpieza de los tercios cervical y medio del canal, antes de intervenir en el tercio apical. La neutralización y remoción del contenido séptico tóxico debe de ser realizada hasta a 2 o 3 milímetros de distancia del ápice radiográfico o del límite del esmalte de rizólisis, con limas tipo K manuales e irrigación/ aspiración con solución de hipoclorito de sodio a 1 por ciento. En los casos que el muñón pulpar tenga vitalidad, se debe llevar a cabo la preparación biomecánica en el límite de la ondometría, o sea, a 1 milímetro del ápice radiográfico o del límite del esmalte de rizólisis, utilizando las limas de segunda serie para los dientes anteriores y las de primera serie para los posteriores. Teniendo en cuenta que, en estos casos, los microorganismos están localizados apenas en el haz del canal principal, la curación entre sesiones no es fundamental, pudiéndose obturar los canales en la misma sesión (44).

8.1.2 NECROPULPECTOMÍA II

Comúnmente, un diente con lesión periapical (rarificación ósea en el área de bi/trifurcación o lesión inter-radicular) es característica un proceso infeccioso de larga duración. Así, los dientes primarios con lesión periapical inter-radicular presentan microorganismos más virulentos y diseminados por todo el sistema de canales radiculares, o sea, el canal principal, los túbulos dentales, las lagunas de asentamiento, erosiones apicales, áreas de rizólisis, e incluso, en la biocapa apical, que son áreas inaccesibles a la preparación biomecánica. Además, se observan alteraciones morfológicas en la región apical, incluyendo la destrucción de las fibras del ligamento periodontal radicular y una reabsorción de los tejidos mineralizados, con exposición de los túbulos dentinarios (44).

9 MEDICAMENTO INTRACONDUCTO

El criterio para un material de relleno ideal del conducto en dientes primarios ha sido descrito por varios autores. El material se debe de reabsorber al mismo tiempo que se reabsorbe los órganos dentarios, debe ser inofensivo para los tejidos periapicales y el germen del órgano dentario permanente, rápida absorción si el material es proyectado más allá del ápice, antiséptico, rellene fácilmente los conductos radiculares, adherencia a las paredes del canal, no se encoge, se puede eliminar fácilmente de ser necesario, en radiografías debe poder observarse una silueta radiopaca y no debe decolorar el diente.

Los tres materiales más utilizados para rellenar los canales primarios de la pulpa son óxido de zinc-eugenol (ZOE), hidróxido de calcio y pastas a base de yodoformo (45).

9.1 OXIDO DE ZINC-EUGENOL

Sweet AC describió en 1930 el uso del óxido de zinc-eugenol (ZOE) como material de relleno del conducto radicular para molares primarios y otros autores lo han apoyado desde entonces gracias al éxito que han logrado con sus pacientes en tratamientos pulpares (46).

El óxido de zinc-eugenol se ha utilizado tradicionalmente como material obturador en la dentición primaria y fue el primer material obturador recomendado para dientes primarios. Sin embargo, su tasa de reabsorción es más lenta que la de los dientes deciduos, además que puede irritar los tejidos periapicales, puede causar necrosis de los huesos y el cemento y puede alterar el camino de la erupción del diente de succión (47).

9.2 HIDROXIDO DE CALCIO

El hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) es un material ampliamente utilizado en los tratamientos de endodoncia desde 1920 cuando Herman lo presentó por primera vez (48).

Es un polvo blanco inodoro con la fórmula química “Ca” y un peso molecular de 74.08 (Farhad y Mohammadi 2005). Tiene baja solubilidad en agua (alrededor de 1.2 g L), que disminuye con un aumento de la temperatura. Se ha demostrado que el coeficiente de disociación del Ca controla la liberación lenta de los iones de calcio e hidroxilo (Rehman et al. 1996).

Esta baja solubilidad es una característica clínica útil, ya que es necesario un período prolongado antes de solubilizarse cuando está en contacto directo con fluidos de tejidos vitales (Spangberg & Haapasalo 2002). El polvo puro tiene un pH alto (aproximadamente 12.5 -12.8) y es insoluble en alcohol (Farhad y Mohammadi 2005). El material se clasifica químicamente como una base fuerte, sus acciones principales provienen de la disociación iónica de los iones Ca^{+} y OH^{-} y su efecto en los tejidos vitales (49).

Sus propiedades para controlar la inflamación, y su actividad antimicrobiana, lo hacen recomendable para su ocupación como medicamento tópico entre sesiones o como componente de materiales de obturación temporarios y definitivos. Es un material ampliamente utilizado en odontología conservadora de fácil manejo, sencilla aplicación y de muy bajo costo (48).

9.3 PASTAS A BASE DE YODOFORMO

Existen varias pastas de hidróxido de calcio (CH) que contienen yodoformo. El CH proporciona el entorno de alto pH (> 10) que, en conjunto con el yodoformo, tiene un alto efecto bacteriostático. Esta combinación puede dar a tales pastas el papel de posiblemente ser materiales ideales para rellenar los conductos radiculares primarios. Estas pastas también parecen absorberse fácilmente durante la reabsorción de la raíz de los dientes primarios. Sin embargo, debido a la falta de estudios de resultados clínicos extensivos, no se puede afirmar que las pastas sean superiores a las ZOE.

El Vitapex es una combinación de 30% de hidróxido de calcio, 40.4% de yodoformo y 22.4% de aceite de silicona. Es radiopaco, premezclado, fácil de usar (punta de jeringa de plástico), fácil de extraer, absorbible si se extruye inadvertidamente más allá del vértice, y se ha convertido en un material popular. Endoflas es un material de uso frecuente en América del Sur. La formulación exacta no está disponible, pero se cree que es CH combinado con yodoformo. No parece tener una tasa de éxito tan alta como el ZOE y una de sus desventajas es que Endoflas debe mezclarse junto a la silla en el momento de la colocación, y debe transportarse hacia el conducto con un léntulo o un instrumento rotatorio.

La pasta KRI es una de las pastas basadas en yodoformo que ha demostrado altas tasas de éxito (84%) en comparación con ZOE (65%) (50). El componente principal de la pasta KRI es el yodoformo (80.8%) combinado con clorofenol, alcanfor y mentol. La pasta de Maisto se introdujo en 1967 como una pasta con yodoformo y ZOE, se informó que tenía tasas de éxito significativamente más altas (100%) en comparación con el uso único del ZOE. La pasta de Walkhoff consta de 80% de pasta de yodoformo y es reabsorbible, pero no existe una investigación clínica para comparar su uso con los otros materiales. Metapex es similar a Vitapex y también tiene una alta tasa de éxito (90.5%), pero no hay ningún estudio que compare estos dos materiales (51).

9.4 CTZ

Cappiello en 1964 recomendó una pasta de cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinc y eugenol (pasta CTZ) para el tratamiento de dientes primarios con pulpitis irreversible y/o necrosis, por lo tanto, los materiales dentales utilizados deben presentar características especiales para poder ser compatibles ya que su relación íntima de los dientes primarios con sus sucesores permanentes los convierte en una unidad interconectada. La región interradicular de los molares primarios proporciona una comunicación pulpa-periodontal en la que los productos de descomposición de la pulpa o materiales tóxicos pueden penetrar la encía y desencadenar una reacción inflamatoria (52).

Existen estudios que indican que la eficacia de la pasta antibiótica CTZ (cloranfenicol, tetraciclina y óxido de zinc-eugenol) se debe a su acción antimicrobiana (53), principalmente debido a la presencia en su composición de dos antibióticos de amplio espectro: tetraciclina y cloranfenicol. El primer medicamento es un antimicrobiano que actúa contra una gran cantidad de bacterias aeróbicas, anaerobios y espiroquetas facultativos, así como contra los microorganismos Gram (+) y Gram (-).

Está contraindicado en niños pequeños y mujeres embarazadas. Entre los efectos secundarios adversos, se han notificado reacciones alérgicas y autoinmunes a los medicamentos, sin embargo, las reacciones alérgicas se consideran menos frecuentes en comparación con otros fármacos. El segundo medicamento es un antibiótico de amplio espectro, que puede ser bactericida en altas concentraciones, ofrece una excelente efectividad contra las bacterias Gram (-) y contra todos los anaerobios; Debido a su gran

solubilidad permiten una amplia distribución por los tejidos y fluidos corporales, aumentando su poder de acción. Su uso prolongado y en dosis muy altas puede llevar a efectos adversos a nivel hematológico. Según Sánchez y otros colaboradores, las reacciones alérgicas a este medicamento son muy raras. El óxido de zinc-eugenol, proporciona propiedades analgésicas y una potente acción antibacteriana contra *Staphylococcus*, *Micrococci*, *Bacillus* y *Enterobacteria* por más de 30 días (54).

JUSTIFICACIÓN

Actualmente en nuestro país existe un alto índice de pacientes infantiles que presentan la enfermedad conocida como caries dental, misma que progresa con infección debido a las bacterias que descomponen el tejido pulpar y en muchas ocasiones pasan de un estado de pulpitis a necrosis pulpar.

Ante un proceso infeccioso como la necrosis pulpar con compromiso perirradicular, es de suma importancia realizar un correcto diagnóstico y tratamiento pulpar, conocido como pulpectomía, para posteriormente realizar su obturación con un material reabsorbible y fisiológicamente tolerable

El uso de las pastas antibióticas es una alternativa para el tratamiento de pulpectomía permitiendo la erradicación total de las bacterias presentes en el conducto radicular, además de que juega un rol importante destacando el tiempo de operatoria en pacientes poco cooperadores, así como sus propiedades antimicrobianas, por ser bacteriostático, bactericida, radiográficamente radiopaco, biocompatible, antiséptico y de fácil remoción.

Hoy en día existe poca información acerca de los distintos materiales de obturación, la decisión de cual usar queda a criterio del profesional, recomendando como primera opción el CTZ ya que sus componentes nos evidencian ser más efectivos al primer mes revelando una reducción o estabilización de las lesiones periapicales referido en diversos estudios.

Este proyecto de investigación se llevará a cabo en la Clínica de Odontología Infantil y en el Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI, el cual cuenta con los materiales y equipos para realizar dicho abordaje científico, por lo que el odontólogo será beneficiado teniendo a su alcance un mejor conocimiento sobre las ventajas y desventajas de la pasta CTZ a nivel antimicrobiano.

OBJETIVOS

10 OBJETIVO GENERAL

10.1 Determinar el efecto antibacterial de una pasta antibiótica contra las cepas bacterianas representativas del microbiota de pulpas necróticas en dientes temporales.

11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

11.1 Determinar el efecto antibacterial de la pasta CTZ a través del Método Kirby-Bauer en contacto con las cepas bacterianas *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*

11.2 Determinar el efecto antibacterial del Ultrapex en grupo control a través del Método Kirby-Bauer en contacto con las cepas bacterianas *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DE ESTUDIO

Estudio experimental, *In vitro*, porque será realizado en un ambiente controlado y prospectivo porque los datos serán recolectados después de la interacción de las pastas medicadas.

VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Variable	Tipo de Variable	Definición Operacional	Indicador	Escala de medición	Análisis estadístico
Actividad antibacteriana <ul style="list-style-type: none"> · <i>Fusobacterium nucleatum</i> · <i>Porphyromona gingivalis</i> · <i>Enterococcus faecalis</i> · <i>Prevotella intermedia</i> 	Dependiente	Medición del halo de inhibición, formado alrededor de un pozo en el agar de 4 mm de diámetro en la que no existe crecimiento bacteriano en una placa petri inoculada con la bacteria	Diámetro del halo de inhibición de las unidades formadoras de colonias	Cuantitativa Numeral	-
Pasta medicada <ul style="list-style-type: none"> · CTZ 	Independiente	Medición de los halos de inhibición	Diámetro del halo de inhibición de las unidades	Cuantitativo	-

			formadoras de colonias		
Pasta medicada · Ultrapex	Independiente	Medición de los halos de inhibición	Diámetro del halo de inhibición de las unidades formadoras de colonias	Cuantitativo	
Control Positivo · Clorhexidina .2%	Independiente	Colocación de 100µl en filtro de papel	Diámetro del halo de inhibición de las unidades formadoras de colonias	Cuantitativo	-
Control Negativo · Medio (HBS)	Independiente	Colocación de 100µl en filtro de papel	No debe existir halo de inhibición para confirmar el crecimiento bacteriano	Cualitativa	-
Tiempo	Independiente	Medición del halo	Tiempo de observación del efecto antibacteriano (72 horas)	Ordinal (No existe una variación)	-

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Cepas bacterianas pertenecientes al grupo de *Enterococcus faecalis*, *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*.

12 Criterios de inclusión:

12.1 Bacterias anaerobias gram-negativas pertenecientes al grupo de *Fusobacterium nucleatum*.

12.2 Bacterias anaerobias gram-positivas pertenecientes al grupo de *Enterococcus faecalis*.

12.3 Bacterias anaerobias gram-negativas pertenecientes al grupo de *Porphyromona gingivalis*.

12.4 Bacterias anaerobias gram-negativas pertenecientes al grupo de *Prevotella intermedia*.

13 Criterios de exclusión:

13.1 Bacterias oportunistas

14 Criterios de eliminación:

14.1 Placas de Petri contaminadas

14.2 Ausencia de crecimiento de las cepas bacterianas

METODOLOGÍA

1. Preparación del Agar

El medio de cultivo Agar se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante, disolviendo 40g del medio deshidratado en 1L de agua destilada, luego se calienta en agua hirviendo y se agita con frecuencia hasta la total disolución aproximadamente por 1 minuto y se retira de la plataforma de agitación.



Figura 2. Preparación de Agar

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI

Autor: Casandra Casanova

Se traspa el Agar en frascos para luego agregar con una pipeta, 5mL de Hemina y proceder a enfriarlo a temperatura ambiente, dejando que tenga contacto por el exterior con agua fría hasta que alcance una temperatura de 45°C, para proseguir con la colocación de vitamina K y sangre desfibrinada al 2%, agitando y evitando que se formen burbujas al verter en las placas Petri.



Figura 3. Hemina, Sangre de carnero desfibrinada y placa Petri final
(De izquierda a derecha)

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI

Autor: Casandra Casanova

2. Proceso de Cepas Bacterias

Las actividades referentes al procesamiento de las cepas bacterianas fueron realizadas bajo el protocolo y supervisión del Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI.

2.1 Adquisición de las Bacterias

Las bacterias fueron adquiridas del Laboratorio de Genética molecular. Se conservaron en su envase original a una temperatura de refrigeración (-80°C) hasta su reactivación.



Figura 4. Caja de Cepas Bacterianas

Fuente: Laboratorio de Biología Periodontal y Genética Molecular, UNAM

Autor: Casandra Casanova

2.2 Reactivación de cepas bacterianas

Para activar las cepas bacterianas, se sembraron en un medio de cultivo Agar Trypticosa de Soya, se incubaron a 37°C por 72 horas y una vez reactivadas, se tomó una muestra y se realizó una transferencia para poder aislar a las bacterias de forma limpia y pura.



Figura 5. Cultivo de la cepa bacteriana

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPEI

Autor: Casandra Casanova

3. Preparación de suspensión bacteriana

Se recogió una porción de colonias bacterianas que se formaron en el medio de cultivo sólido previamente elaborado mediante un asa microbiológica estéril y la colocamos en medio de cultivo, para luego obtener la carga bacteriana ideal ya establecida por la máquina D30, siendo de esta manera una suspensión a la escala 1 de turbidez de McFarland.



Figura 6. Preparación de la suspensión bacteriana

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPEI

Autor: Casandra Casanova

4. Colocación de CTZ en Placa Petri

Mediante la ayuda de un punch para biopsia de 4 mm de diámetro, se procedió a la confección de un pozo en el agar en una placa Petri para la colocación de la pasta medicada CTZ y en otra placa Petri para la pasta medicada Ultrapex.

Para el grupo control positivo y negativo no fue necesaria la confección de pozos, se utilizaron filtros de papel de 3 mm de diámetro con una distancia de 10 mm entre ellos.



Figura 7. Práctica de preparación de pozos

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI **Autor:** Casandra Casanova

5. Inoculación de cepas bacterianas

Con la ayuda de una pipeta se tomaron 50 μ l de la suspensión a la escala 1 de McFarland y se procede a realizar la siembra en el agar mediante un asa estéril utilizando la técnica por extensión.



Figura 8. Inoculación de placa Petri

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPEI

Autor: Casandra Casanova

6. Composición y manejo de pastas medicadas

6.1 CTZ

La pasta utilizada es fabricada en la Universidad Autónoma de México y su contenido en frasco es de 40 gr, la composición consta de 50 gr de Oxido de Zinc, 10 gr de Cloranfenicol y 10 gr de Tetracilina. Este polvo es resguardado en un frasco color ámbar para evitar su exposición solar, humedad y su caducidad es de 30 días.

La porción por utilizar en el pozo de agar consta de 1 cucharadita medidora de ionómero al ras (113mg) y 12.5 μ l de eugenol, se mezcla uniformemente hasta tener una consistencia pastosa y se coloca con la ayuda de una dicalera estéril dentro del pozo hasta cubrirlo por completo.



Figura 9. Balanza electrónica con CTZ

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI

Autor: Casandra Casanova

6.2 Ultrapex

El ultrapex es una pasta premezclada a base de hidróxido de calcio con yodoformo y glicerina, no fue necesario realizar nada más que la aplicación dentro del pozo de agar rellenándolo por completo.

7. Control positivo y negativo

La clorhexidina al .2% y el medio fueron colocados en filtros de papel con pipetas y puntas estériles en una cantidad de 10 μ l cada una.

8. Incubación de la muestra

Una vez finalizada la colocación de sustancias de estudio, se procedió a incubar las muestras, dicho proceso se llevó a cabo dentro de una cámara de anaerobiosis que brindará la temperatura correcta de 34°C para el crecimiento bacteriano durante 72 horas.



Figura 10. Cámara de anaerobiosis

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI

Autor: Casandra Casanova

9. Medición de Halos y captura de resultados

Para medida de los halos de inhibición se utilizó una regla, la cual nos determinó la cantidad de diámetro en milímetros de cada halo. La lectura se realizó a las 72 horas y las mediciones se catalogaron en la ficha de recolección de datos para la captura posterior de la placa Petri con el dispositivo aCOLyte 3 HD.



Figura 11. Medición de Halo y software aCOLyte 3 HD

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI

Autor: Casandra Casanova

ASPECTOS ÉTICOS

Este proyecto de investigación se sustenta de acuerdo con los principios científicos y éticos que no atentan la integridad de los tejidos involucrados, teniendo en cuenta las medidas establecidas en la NOM-013-SSA-1994.

RESULTADOS

En función de los cuatro microorganismos suministrados por el Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI, se dividieron los dos medicamentos a estudiar en placas Petri individuales debido a su efecto antimicrobiano (CTZ y Ultrapex) y los grupos control a estudiar en una placa Petri, siendo un total de 12 placas Petri.

Los resultados obtenidos se redactaron de mayor a menor de acuerdo a la sensibilidad de la pasta antimicrobiana conocida como CTZ. *P. intermedia* es la cepa con mayor sensibilidad presentando un halo de inhibición de 70 mm, seguida por *F. nucleatum* y *P. gingivalis* con un halo de inhibición de 65 mm. La cepa bacteriana más resistente al CTZ fue *E. faecalis* presentando 31 mm de halo de inhibición.

<i>Enterococcus faecalis</i>	
Medicamento	Halo de Inhibición (mm)
Ultrapex	0
CTZ	31
Clorhexidina	10
Medio	0



Figura 1. *E. faecalis*: CTZ, Ultrapex, Medio, Clorhexidina (Izq a Der)

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI

Autor: Casandra Casanova

El *P.intermedia* fue la única cepa bacteriana que presentó sensibilidad hacia el Ultrapex, creando un halo de inhibición de 70 mm, mientras que *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *E. faecalis* tuvieron crecimiento sobre de toda la superficie de la placa Petri a analizar.

<i>Prevotella intermedia</i>	
Medicamento	Halo de Inhibición (mm)
Ultrapex	0
CTZ	70
Clorhexidina	20
Medio	0



Figura 2. *P. intermedia*: CTZ, Ultrapex, Medio, Clorhexidina (Izq a Der)

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI

Autor: Casandra Casanova

E. faecalis es la única cepa bacteriana que presentó un poco más de resistencia que las demás respecto a la clorhexidina, evidenciando un halo de inhibición de 10 mm. *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* obtuvieron un halo de inhibición de 20 mm.

<i>Fusobacterium nucleatum</i>	
Medicamento	Halo de Inhibición (mm)
Ultrapex	0
CTZ	65
Clorhexidina	20
Medio	0



Figura 3. *F. nucleatum*: CTZ, Ultrapex, Medio, Clorhexidina (Izq a Der)

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI

Autor: Casandra Casanova

<i>Porphyromona gingivalis</i>	
Medicamento	Halo de Inhibición (mm)
Ultrapex	0
CTZ	65
Clorhexidina	20
Medio	0



Figura 4. *P. gingivalis*: CTZ, Ultrapex, Medio, Clorhexidina (Izq a Der)

Fuente: Laboratorio de Genética Molecular de la DEPeI

Autor: Casandra Casanova

DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como propósito demostrar que el uso de una pasta antibiótica tiene resultados satisfactorios contra diferentes cepas representativas de infecciones necróticas de órganos dentarios infantiles. Se pretendió examinar a la cepa más susceptible a los antimicrobianos. Además, se realizó el mismo método para determinar si el material número uno de la comunidad odontopediátrica conocido como Ultrapex presentaba actividad antimicrobiana contra estas mismas cepas y también se presentó un control negativo y un control positivo (clorhexidina).

La presente investigación utilizó la bacteria *Enterococcus faecalis*, considerada prevalente en conductos radiculares con fracaso en los tratamientos pulpares y obturaciones temporadas, e incluso, mostrando aún su virulencia en presencia de medicación intraconducto (37,55). *Fusobacterium nucleatum* también fue evaluado debido a su capacidad de adhesión a las células epiteliales y su infiltración en tejidos profundos, se ve implicado en varias formas de enfermedad periodontal pero también está incluida en infecciones pulpares (56). *Porphyromona gingivalis* se encarga por su parte, de perpetuar el estado inflamatorio e interferir con los mecanismos de producción de citoquinas y muerte celular en las células del huésped, lo que resulta finalmente en la destrucción del tejido pulpar (39). *Prevotella intermedia* es un microorganismo que se detecta con frecuencia en los estudios especializados de PCR, Tavares *et al.* Detectaron su presencia en un 96.9% de las muestras con pulpa necrótica y U. Thimmegowda *et al.* un 53.3% de sus muestras (57,58).

Del análisis de los resultados de este estudio se puede afirmar que la acción antimicrobiana del CTZ fue exitoso, presentando el *E. faecalis* un halo de inhibición de 31 mm, *F. nucleatum* de 65 mm, *P. gingivalis* de 65 mm y *P. intermedia* de 70 mm, siendo el *E. faecalis* el de mayor resistencia a la inhibición bacteriana y el *P. intermedia* el más susceptible.

Una investigación que tuvo como objetivo analizar *in vitro* la acción antimicrobiana de la pasta CTZ sobre el *E. faecalis*, se logró observar un halo de inhibición promedio de 30 mm, concluyendo en su investigación que esta pasta puede ser una alternativa al tratamiento endodóntico radical, evitando la pérdida temprana de dientes deciduos con afectación pulpar (59). Adl *et al.* utilizó en su ensayo el método de difusión de pozos agar y el método de MIC para determinar la eficacia de nueve grupos de medicamentos evaluándolos en cuatro concentraciones (25, 50, 100 y 200 µg por ml), los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento se registraron y evaluaron, dando como resultado general que la triple pasta antibiótica (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina) en combinación con solución salina normal o clorhexidina al 2% producirá la mayor zona de inhibición contra *E. faecalis*. Los resultados también demuestran que la Minociclina es el componente más eficaz de la pasta antibiótica (60,61).

La bacteria *Porphyromona gingivalis* es la bacteria más prevalente en necrosis pulpar y lesiones periapicales, en una investigación se comparó la susceptibilidad de este microorganismo frente a la pasta 3 mix (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina), indicando que no se observó la formación de halos, ya que el medicamento inhibió completamente el crecimiento, resultados similares a lo que se observó en este estudio (59).

Mattos *et al.* tuvo como propósito evaluar los efectos antimicrobianos de una pasta endodóntica preparada con tetraciclina, tiamfenicol y óxido de zinc, también se consideró utilizar como control positivo a la tetraciclina para el análisis de diversas cepas bacterianas entre las cuales se encuentra *Fusobacterium nucleatum*. Los resultados obtenidos demuestran la efectividad de esta pasta antibiótica y del control positivo, aceptando su uso en la odontopediatría ya que se muestra un efecto en el halo de inhibición de 30 mm en ambos casos (62).

Pérez H *et al.* emplearon la pasta antibiótica CTZ mediante la técnica de endodoncia no instrumentada en la cual no se elimina por completo el tejido necrótico infectado y eliminando los microorganismos presentes en necrosis pulpar, obteniendo evolución favorable en la zona interradicular en el 85,7% de los casos (7).

Piva *et al.* comparó diversos medicamentos (CTZ, OZE, CALEN, MTA, L&C) según su halo de inhibición y su acción antimicrobiana. En los materiales ensayados, las pastas Guedes-Pinto y CTZ tuvieron un halo de inhibición significativamente mayor que el OZE, CALEN, MTA y L&C, sin embargo, entre la pasta Guedes-Pinto y la pasta CTZ no existió una diferencia significativa, su halo máximo de ambas pastas fue de 21 mm actuando sobre diversas cepas bacterianas, entre las cuales se encontraba el *Enterococcus faecalis* (64).

Una de las desventajas que genera la resistencia hacia el uso de la pasta CTZ en los odontopediatras, son las manchas dentales a causa de la Tetracilina, ya que durante el periodo de la odontogénesis se produce un oscurecimiento dental. Sin embargo, se identificó que este antibiótico no actúa localmente y que cualquier mancha que pueda ocurrir se debe a la inflamación en la región periapical generada por la participación pulpar del predecesor deciduo (65,66).

Amorin *et al.* determinaron la eficacia antimicrobiana y biocompatibilidad de diversas pastas empleadas, estas fueron analizadas mediante dos métodos experimentales y se llegó a la conclusión que por el método de exposición directa todas las pastas empleadas mostraron eficacia antimicrobiana; sin embargo, mediante el método de difusión en agar, la pasta CTZ presentó la mejor actividad antimicrobiana (67). Otro estudio realizado en Brasil llevando a cabo una metodología parecida, expuso resultados similares con la pasta CTZ, siendo esta la pasta con mayor ausencia de crecimiento bacteriano (64).

Es importante mencionar que la realización de un estudio experimental *in vitro* tiene limitaciones con respecto a la traducción de los resultados a la práctica clínica, pero a su vez nos permite controlar algunos factores que no serían posibles en un estudio *in vivo*, tales como la temperatura, el tiempo, la cantidad de material y, sobre todo, las cepas bacterianas pertenecientes a la pulpa necrótica.

Actualmente, se investigan diversas alternativas para la medicación intraconducto, que contemplan elementos sintetizados en laboratorio y sustancias obtenidas a partir de productos naturales, como es el caso del própolis o propóleo, una sustancia resinosa y pegajosa, de color verde pardo, castaño o negro con sabor acre que es elaborado por la

abeja *Apis mellifera* mediante exudados vegetales mezclados con sustancias propias de las abejas y con los bálsamos procedentes del polen, cuya función en la colmena es de sellarla herméticamente e impedir infecciones en ella (68).

Al propóleo se atribuyen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias, cicatrizantes, anestésicas, antitumorales e inmunomoduladores. En cuanto a su actividad antimicrobiana el mecanismo de acción del propóleo es complejo y se atribuye a la sinergia entre los elementos que lo componen, como flavonoides, ácidos grasos, ácidos aromáticos, ésteres, hidroxiácidos, sesquiterpenos y otros compuestos fenólicos. Es capaz de inhibir la síntesis de mediadores del proceso de inflamación, como las prostaglandinas y leucotrienos, así como promover la actividad fagocítica (69).

Torres Mantilla *et al* compararon el efecto antibacteriano de un extracto etanólico de propóleo en dos concentraciones (20% – 30%) y a las 24 horas y 48 horas frente a *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* obteniendo halos de inhibición de 10.32 mm - 14.23 mm con *E. faecalis* a las 24 horas y de 11 mm – 14.96 mm a las 48 horas. Los resultados con *F. nucleatum* fueron a los 7 días con un halo de inhibición al 20% de 18.89 mm y con un 30% se observaron halos de inhibición con media de 23.17 mm (70).

Dicha investigación evidenció que un extracto etanólico elaborado a partir del propóleo tiene efecto bacteriano a concentraciones de 20% y 30% contra cepas de una pulpa necrótica, sin embargo, a pesar de tener similitudes con la investigación del CTZ, existe sin duda una mayor inhibición bacteriana con la pasta CTZ, obteniendo halos de que triplican en tamaño.

Gilad *et al*. Realizó un estudio en el que desarrolló un nuevo dispositivo de administración local que libera una dosis sustancial de clindamicina en los conductos radiculares. Fabricó fibras de etileno vinil acetato impregnadas de dicho antibiótico y estableció la sensibilidad de los microorganismos endodónticos en un modelo *in vitro*, concluyendo que la clindamicina es particularmente efectiva contra las especies de *Prevotella intermedia* y *Porphyromona*. La sensibilidad bacteriana a la clindamicina se evaluó colocando 10/~1 gotas de diferentes concentraciones de solución salina tamponada

con clindamicina, demostrando grados variables de inhibición, *P. intermedia* mostró el mayor grado de sensibilidad (>100mm), seguida de *F. nucleatum*, *P. micros* y *S. intermedius* (71).

Por otro lado, se ha descubierto que los aceites esenciales también poseen una excelente actividad farmacológica-antibacteriana y antifúngica, por lo tanto, son una nueva fuente prometedora de fármacos naturales. El aceite de orégano y de palo rosa han demostrado una notable actividad contra *E. faecalis* en ensayos in vitro (72). En un estudio realizado por Tiwari G. *et al* se utilizaron aceites esenciales en combinación con hidróxido de calcio y se compararon con una pasta antibiótica que contenía ciprofloxacino, metronidazol y minociclina; todos los medicamentos fueron efectivos al inhibir el crecimiento bacteriano, el aceite de orégano fue el segundo halo de inhibición más grande con un resultado de 25 mm y en primer lugar la pasta antibiótica con un halo de inhibición de 27.4 mm (73).

Los resultados del presente estudio respaldan las pautas de la Academia Estadounidense de Odontología Pediátrica en las que prefieren las pastas endodónticas que contienen antibióticos. De hecho, nuestros resultados demostraron que la pasta CTZ presenta una excelente actividad antimicrobiana contra las bacterias de infecciones endodónticas en dientes temporales. Aunque la prueba de difusión en agar puede no proporcionar condiciones similares para comparar diferentes sustancias, con diferentes propiedades de solubilidad y difusión, tiene suficiente sensibilidad y puede usarse como un método de detección de primer paso de materiales antimicrobianos.

CONCLUSIÓN

En esta investigación, la pasta CTZ presentó valores altos de inhibición del crecimiento frente a las bacterias ensayadas, obteniendo el *Enterococcus faecalis* el puesto de la cepa con mayor resistencia y la *Prevotella intermedia* la cepa con mayor sensibilidad a los antibióticos. Estos resultados también fueron encontrados por otros investigadores que recomendaban la adición de medicación antimicrobiana en las pastas de obturación utilizadas en los dientes temporales porque proporcionan la eliminación de microorganismos después de la terapia pulpar.

Esta pasta se compone de antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro. El óxido de zinc tiene una tasa de absorción baja cuando se usa en pastas para rellenar los conductos radiculares de los dientes temporales y el eugenol también tiene acción antimicrobiana. En este informe, la pasta CTZ mostró resultados *in vitro* superiores a los demostrados por el ultrapex, nuestro grupo control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harris-Ricardo J, Fang L, Herrera-Herrera A, Fortich-Mesa N, Olier-Castillo D, Cavanzo-Rojas D, et al. Perfil bacteriano del biofilm dental supragingival en niños con dentición temporal y mixta temprana utilizando la técnica de secuenciación de próxima generación (HOMINGS). *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2018;(xx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.10.019>
2. Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LAB. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J*. 2008;41(8):664-9.
3. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):78-85.
4. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(1):24-34.
5. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections - an update. *Apmis*. 2017;125(4):376-84.
6. Colorado Vélez C. Biopelícula extrarradicular: reporte de un caso clínico. *Rev Nac Odontol*. 2015 May 16;11(20).
7. Neves BG, Stipp RN, Bezerra D da S, Guedes SF de F, Rodrigues LKA. Quantitative analysis of biofilm bacteria according to different stages of early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2018;96(August):155-61.
8. Akshay Satwik T, Solite P, Sarah Sathiyawathie R. Role of biofilms in endodontics. *Drug Invent Today*. 2019;11(4):844-8.
9. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano

- N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2019;24(3):e364-72.
10. Haldal S, Muhammed Yazar Arafath KP, Subair K, Joseph K, Rajesh. Biofilms in Endodontics. *J Int Oral Heal*. 2016;8(7):827-9.
 11. Cruz Quintana SM, Díaz Sjostrom P, Arias Socarrás D, Mazón Baldeón GM. Microbiota of oral cavity ecosystems. *Rev Cubana Estomatol*. 2017;54(1):84-99.
 12. Heller D, Helmerhorst EJ, Gower AC, Siqueira WL, Paster BJ, Oppenheim FG. Microbial Diversity in the Early In Vivo -Formed Dental Biofilm. 2016;82(6):1881-8.
 13. J.P B. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol*. 2003;30:7-9.
 14. Sarduy L, González M. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Rev Científica Medicentro Villa Cl*. 2016;20(3):167-75.
 15. Ferrer YM, Elena IM, Collazo F, Vila ID. Urgencias estomatológicas por lesiones pulpares Dental emergencies caused by pulpar lesions. *Rev Cubana Estomatol*. 2012;49(4):286-94.
 16. Del CE, Socorro P, Zavala M, Cuevas RP, Del I, Baas RC. Enfermedades pulpares y periapicales en estructuras dentales permanentes en pacientes con edades de seis-catorce años Pulp and periapical diseases in permanent dental structures of patients aged six to fourteen years. *Rev Cubana Estomatol*. 2017;54(3):1-10.
 17. Lasala A. Madrid: Ed. Masson-Salvat Odontología. Endodoncia. 1992. 69-104 p.
 18. Ferrer D, Hernández A, García O, Rodríguez Y, Pérez M, Liriano R. Caracterización de las enfermedades pulpares en pacientes pertenecientes al Área II del municipio Cienfuegos. *Medisur*. 2017;15(4):327-32.
 19. Abbott P V., Yu C. A clinical classification of the status of the pulp and the root canal system. *Aust Dent J*. 2007;52(1 SUPPL.):17-31.
 20. Fuks B. Anna KA and GM. Therapy for the Primary Dentition. Sixth Editi. Elsevier B.V.; 2019. 329-351 p.

21. Delgado Cedeño Jacqueline. Diagnóstico y tratamiento de la pulpitis aguda supurada en dientes anteriores. Universidad de Guayaquil.
22. Chávez de Paz L.E DG. Endodontic Prognosis. In: Endodontic Prognosis. Springer International Publishing Switzerlan; 2017. p. 13-27.
23. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Braz Oral Res.* 2017;31:1-7.
24. Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe.* 2017;48:12-8.
25. Siqueira JF, Rôças IN. Critical review in oral biology and Medicine: Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009;88(11):969-81.
26. Siqueira JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):281-93.
27. Siqueira JF, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J.* 2014;216(6):305-12.
28. Peters LB, Peterson B, Jaramillo DE. The Use of Scanning Electron Microscopy (SEM) in Visualizing the Root Canal Biofilm. :87-101.
29. Sakko M, Tjäderhane L, Rautemaa-richardson R. Microbiology of root canal infections. 2016;5(2):84-9.
30. Silva LAB da, Nelson-Filho P, Faria G, Souza-Gugelmin MCM de, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J.* 2006;17(2):144-8.
31. Paikkatt JV, Aslam S, Sreedharan S, Philomina B, Kannan VP. Efficacy of various intracanal medicaments against aerobic and facultative anaerobic microorganism found in human primary teeth with necrotic pulp : A randomized clinical trial. 2018;268-72.

32. Yun KHEE, Lee H, Nam OKH, Moon CY, Lee J, Choi SC. Analysis of bacterial community profiles of endodontically infected primary teeth using pyrosequencing. 2016;1-10.
33. Nelson-filho P, Ruviére DB, Queiroz AM De. Comparative Molecular Analysis of Gram-Negative Bacteria in Primary Teeth with Irreversible Pulpitis or Periapical Pathology. (4):259-64.
34. Zerón Agustín V de G. *Fusobacterium nucleatum*. 2016;73(6):280-5.
35. Yiping HW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol*. 2016;141-7.
36. Ivohne K, Maquera P. Medicación intraconducto frente al *Enterococcus faecalis* Intraconduct drugs against *Enterococcus faecalis*. 2019;3(2):49-55.
37. Rodríguez-niklitschek C, V GHO. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth : Literature review Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis*. 2015;19(3):177-82.
38. Kobayashi R, Kobayashi T, Sakai F, Hosoya T, Yamamoto M. Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective in preventing *Porphyromonas gingivalis* -accelerated periodontal disease. *Sci Rep*. 2017;(June 2015):1-10.
39. Britos MR, Sin CS, Ortega SM. *Porphyromonas gingivalis* , patógeno de relevancia en la enfermedad periodontal. :46-9.
40. Fteita D, Könönen E, Söderling E, Kahraman U. Anaerobe Effect of estradiol on planktonic growth , coaggregation , and bio fi lm formation of the *Prevotella intermedia* group bacteria. *Anaerobe*. 2014;27:7-13.
41. Sarwar, M., Ohara-Nemoto, Y., Kobayakawa, T., Naito, M., & Nemoto TK. Characterization of substrate specificity and novel autoprocessing mechanism of dipeptidase A from *Prevotella intermedia*. *Biol Chem*. 2020;401(5):629-42.
42. Cortés O, Beltri P, Miegimolle M, Ortego G, Barrachina M, Hernández M.

- Tratamientos pulpares en dentición temporal. *Odontol Pediátrica* [Internet]. 2010;18(2):1-6.
43. Pratha AA, Jeevanandan G. Instrumentation techniques for pulpectomy in primary teeth - A review. 2018;10(2):4-5.
 44. De Lourdes De Andrade M, Italo M, Faraco M, Filho PN, Borba De Araújo F, Percinoto C. Terapia Pulpar En Dientes Primarios Y Permanentes Jóvenes 17 Capítulo. :155-74.
 45. Özalp et al. Evaluation of various root canal filling materials in primary molar pulpectomies: An in vivo study. *American Journal of Dentistry*, Vol-18, No. 6, December, 2005.
 46. Bahrololoomi Z, Zamaninejad S, Dentistry P, Sadoghi S, Sciences M. Success Rate of Zinc Oxide Eugenol in Pulpectomy of Necrotic Primary Molars: A Retrospective Study. 2015;4(2):89-94.
 47. Navit S, Jaiswal N, Khan SA, Malhotra S, Sharma A, Mukesh, et al. Antimicrobial efficacy of contemporary obturating materials used in primary teeth- an in-vitro study. *J Clin Diagnostic Res*. 2016;10(9):9-12.
 48. ELIZONDO AL, FANNY LM, RICARDO TE. Hidróxido de calcio. *Rev Mex Estoatologia*. 2017;4(2):59-60.
 49. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011 Aug;44(8):697-730.
 50. Wright KJ, Barbosa S V., Araki K, Spångberg LS. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Kri 1 paste and zinc oxide-eugenol used in primary tooth pulpectomies. *Pediatr Dent*. 1994;16(2):102-6.
 51. Chen J-W, Jorden M. Materials for primary tooth pulp treatment: the present and the future. *Endod Top*. 2012;23(1):41-9.
 52. Moura L de FA de D, Lima M de DM de, Lima CCB, Bandeira AVL, Moura MS de, Conde Júnior AM, et al. Cellular profile of primary molars with pulp necrosis

- after treatment with antibiotic paste. *Int J Exp Pathol*. 2018;99(5):264-8.
53. Luengo Ferreira J, Ramos Medina A, Hernández Montoya ME, Díaz Rosas CY, Medrano LEC, Toscano García I. Efectividad Clínica y Radiográfica de la Pasta Antibiótica CTZ en Pulpotomías de Molares Primarios: Ensayo Clínico Aleatorio Controlado. *Int J Odontostomatol*. 2016;10(3):425-31.
 54. Carlos-Medrano LE, Toscano-García I, Ayala-Jiménez S, Anaya-Álvarez M, Luengo-Ferreira J. Clinical and Radiographic Evaluation of Formocresol and Chloramphenicol, Tetracycline and Zinc Oxide-Eugenol Antibiotic Paste in Primary Teeth Pulpotomies: 24 month follow up. *J Clin Pediatr Dent*. 2018;43(1):16-21.
 55. Holmberg A, Rasmussen M. Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84(1):19-21.
 56. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol*. 2015;23:141-7.
 57. Tavares WLF, Neves De Brito LC, Teles RP, Massara MLA, Ribeiro Sobrinho AP, Haffajee AD, et al. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Int Endod J*. 2011;44(3):225-35.
 58. Thomas J, Bilichodmath S, Preethi N, Thimmegowda U. Identification of Specific Anaerobic Bacteria in Endodontic Infections of Primary Teeth—A PCR Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2019;12(1):1-4.
 59. Reis BDS, Cristina C, Barbosa N, Soares LDC, Brum SC. Como Material Obturador Na Terapia Pulpar De Dentes Decíduos. 2016;07(3):39-42.
 60. Adl A, Shojaee NS, Motamedifar M. A Comparison between the Antimicrobial Effects of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide Against *Enterococcus faecalis* Introduction Materials and methods Agar well diffusion assay method. 2012;7(3):11-8.

61. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2004;37(11):756-63.
62. Fátima E De, Smânia A, Jr AS, Filho RR. Antimicrobial activity of endodontic paste prepared with tetracycline , thiamphenicol and zinc oxide assessed using agar diffusion method *Atividade antimicrobiana de pasta endodôntica preparada com tetraciclina , tianfenicol e óxido de zinco avaliada pelo.* 2010;(January).
63. Calixto, K., Correa, E., Anchelia R. Efectividad clínica y radiográfica de dos pastas antibióticas empleadas en necrosis pulpar en niños de un hospital nacional del Perú. *Kiru.* 2014;11(2):115-22.
64. Piva F, Faraco Junior IM, Feldens CA, Estrela CR de A. Ação antimicrobiana de materiais empregados na obturação dos canais de dentes decíduos por meio da difusão em ágar: Estudo in vitro. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2009;9(1):13-7.
65. Reis BS, Barbosa CCN, Soares LC, Brum SC, Barbosa OLCB MM. Análise “in vitro” da atividade antimicrobiana da pasta ctz utilizada como material obturador na terapia pulpar de dentes decíduos. *Rev Pró-UniverSUS.* 2016;07(3):39-42.
66. de Oliveira SCM, de Omena ALCS, Lira GA de L, Ferreira IA, Imperato JCP, Calvo AFB. Do different proportions of antibiotics in the CTZ paste interfere with the antimicrobial action? In vitro study. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2019;19(1):1-8.
67. de Amorim LFG, de Toledo OA, Estrela CRA, de Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J.* 2006;17(4):317-22.
68. Vargas-Sánchez RD, Torrescano-Urrutia GR, Mendoza-Wilson AM, Vallejo-Galland B, Acedo-Félix E, SánchezEscalante JJ, et al. Mecanismos Involucrados En La Actividad Antioxidante Y Antibacteriana Del Propóleos. *Biocencia.* 2014;16(1):32.

69. Frank, Sacsquispe-Contreras S, Ceccarelli-Calle J, Alania-Mallqui J. Propóleo Peruano: una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología / Peruvian Propolis: a new alternative in dental antimicrobial therapy. *Rev estomatol HereD*. 2012;22(1):50–8.
70. Torres Mantilla JD. Comparación del efecto antibacteriano de un extracto etanólico de propóleo a dos concentraciones y del paramonoclorofenol alcanforado frente a *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*. *Rev Científica Odontológica*. 2019;7(1):53-65.
71. Gilad JZ, Teles R, Goodson M, White RR, Stashenko P. Development of a clindamycin-impregnated fiber as an intracanal medication in endodontic therapy. *J Endod*. 1999;25(11):722-7.
72. Benbelaïd F, Khadir A, Abdoune MA, Bendahou M, Muselli A, Costa J. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014;4(6):463-72.
73. Tiwari G, Patil S, Bondarde P, Khadke S, Gakhare R. Antimicrobial efficacy of commercially available plant essential oils with calcium hydroxide as intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* : An in-vitro study. 2018;17(6):19-24.