

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**COMPARACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE
LACTOBACILLUS REUTERI E HIDRÓXIDO DE CALCIO
UTILIZADOS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO FRENTE A
*ENTEROCOCCUS FAECALIS***

**TRABAJO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

PRESENTA

C.D. CLAUDIA MINERVA SANDOVAL PARRA

PRESIDENTE

(DIRECTORA DEL PROYECTO)

DRA. MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES HOFMANN SALCEDO

SINODAL

(CO-DIRECTORA DEL PROYECTO)

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

SINODAL

(CO-DIRECTORA DEL PROYECTO)

DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ

SINODAL

(CO-DIRECTORA DEL PROYECTO)

DRA. DULCE YICEL MAGAÑA MANCILLAS

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA; MÉXICO

JUNIO 2024

**COMPARACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE
LACTOBACILLUS REUTERI E HIDRÓXIDO DE CALCIO
UTILIZADOS COMO MEDICACIÓN INTRA CONDUCTO FRENTE A
*ENTEROCOCCUS FAECALIS***

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas afromexicanas"
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **COMPARACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *LACTOBACILLUS REUTERI* E HIDRÓXIDO DE CALCIO UTILIZADOS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**

Propuesto por la **C.D. CLAUDIA MINERVA SANDOVAL PARRA**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"



DRA. MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES HOFMANN SALCEDO
PRESIDENTE

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas afro-mexicanas"
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **COMPARACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LACTOBACILLUS REUTERI E HIDRÓXIDO DE CALCIO UTILIZADOS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO FRENTE A ENTEROCOCCUS FAECALIS.**

Propuesto por la **C.D. CLAUDIA MINERVA SANDOVAL PARRA**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"



DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ
SINODAL

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas afromexicanas"
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **COMPARACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *LACTOBACILLUS REUTERI* E HIDRÓXIDO DE CALCIO UTILIZADOS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**

Propuesto por la **C.D. CLAUDIA MINERVA SANDOVAL PARRA**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"



DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ
SINODAL

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas afroamericanas"
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **COMPARACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *LACTOBACILLUS REUTERI* E HIDRÓXIDO DE CALCIO UTILIZADOS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**

Propuesto por la **C.D. CLAUDIA MINERVA SANDOVAL PARRA**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"



DRA. DULCE YICEL MAGAÑA MANCILLAS
SINODAL

COMPARACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *LACTOBACILLUS REUTERI* E HIDRÓXIDO DE CALCIO UTILIZADOS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.

PRESENTA



C.D. CLAUDIA MINERVA SANDOVAL PARRA

PRESIDENTE
(DIRECTORA DEL PROYECTO)



DRA. MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES HOFMANN SALCEDO

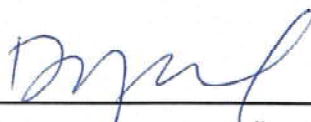
SINODALES
(CO-DIRECTORAS DEL PROYECTO)



DRA. ANA GABRIELA CARRILLO
VÁRGUEZ



DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ
VELÁZQUEZ



DRA. DULCE YICEL MAGAÑA MANCILLAS

Tijuana, Baja California, 31 de mayo de 2024

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi profundo agradecimiento hacia mi familia: a mi papá Víctor Sandoval, por ser mi primer gran maestro en la vida y en la endodoncia, gracias papi por apoyarme en todas mis metas y heredarme esas ganas de querer superarse y de seguir aprendiendo día con día. A mi mamá Lorena Parra, gracias por siempre estar ahí para escuchar mis alegrías y mis tristezas, por apoyarme y alentarme a seguir mis sueños, gracias por siempre dar lo mejor de ti para nosotros. A mis hermanos, Ivette, Edgar y Ulises, gracias por siempre estar ahí, por hacer todo más divertido, gracias hermana, por siempre darme ánimos y por todos tus buenos consejos que me han ayudado tanto. Todos mis logros son gracias a ustedes, mi familia.

Gracias a mis amigos y compañeros de especialidad, por ser los mejores compañeros de viajes, de aventuras y por tantos momentos de diversión que pasamos en estos dos años, los quiero mucho y se llevan un lugar enorme en mi corazón, les deseo a todos una vida llena de felicidad y éxitos.

Gracias Dra. Ana Gabriela Carrillo, Co-directora de esta tesis, por todo su apoyo, por su dedicación a la institución y por darme la oportunidad de ser parte de su posgrado.

Gracias especiales a la Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez, Co-directora de esta tesis, por todo el apoyo que me dio para que este proyecto fuera posible, mi entera admiración y gratitud hacia usted.

Gracias a la Dra. Dulce Magaña y a la Dra. Elena Hofmann por su disposición y por ser parte de este logro.

De igual manera, gracias a todos los docentes que fueron parte de mi formación académica, me llevo grandes aprendizajes de cada uno de ustedes.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer a las siguientes instituciones:

A la Universidad Autónoma de Baja California por abrirme nuevamente las puertas de su institución para completar mi formación como especialista.

Al Laboratorio de Evaluación Microbiológica de Biomateriales de la facultad de Odontología-Tijuana, UABC; por permitirme realizar la experimentación en sus instalaciones. Responsable: Dr. Leonardo Daniel Acosta Torres Very.

Al Laboratorio Zapata: Diagnóstico Microbiológico, Inmunológico y Análisis Clínicos. Tijuana, México por la donación de la cepa *E. faecalis*.

A CONAHCyT por la beca otorgada, No. CVU: 1226141.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	<i>i</i>
CONTENIDO	<i>iii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>vi</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>vii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>viii</i>
I. RESUMEN	1
I. ABSTRACT	2
II. INTRODUCCIÓN	3
2.1. CARIES	3
2.2. NECROSIS PULPAR	4
2.3. PERIODONTITIS APICAL	5
2.3.2. Bacterias planctónicas	6
2.3.1. Biopelícula	6
2.4. INFECCIÓN ENDODÓNTICA	6
2.4.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	8
2.5. AGENTES IRRIGANTES	8
2.6. MEDICACIÓN INTRACONDUCTO	9
2.6.1. HIDRÓXIDO DE CALCIO	10
2.7. PROBIÓTICOS	11
2.7.1. <i>Lactobacillus</i>	14
2.7.1.1. <i>Lactobacillus reuteri</i>	14
2.8. POLOXÁMERO 407	17
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19

IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. HIPÓTESIS	21
5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	21
5.2. HIPÓTESIS NULA (H0)	21
5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)	21
VI. OBJETIVOS	22
6.1. OBJETIVO GENERAL	22
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
VII. VARIABLES	23
7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES	23
7.2. VARIABLE DEPENDIENTE	23
7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES	23
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	24
8.1. TIPO DE ESTUDIO:	24
8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO:	24
8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL	24
8.4. METODOLOGÍA	25
8.4.1. Método de difusión en discos	25
8.4.1.1. Extracción de <i>L. reuteri</i>	26
8.4.1.2. Preparación del vehículo	27
8.4.1.3. Crecimiento de <i>E. faecalis</i>	27
8.4.1.4. Protocolo McFarland	28
8.4.1.5. Preparación de la solución en gel de <i>L. reuteri</i>	29
8.4.1.6. Transportación de la solución en gel de <i>L. reuteri</i> a los medios de cultivo	30
8.4.1.7. Evaluación de la zona de inhibición bacteriana	31

8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
IX. RESULTADOS	32
9.1. Evaluación de la zona de inhibición bacteriana	32
9.2. Análisis estadístico	35
X. DISCUSIÓN	40
XI. CONCLUSIONES	43
XII. RECOMENDACIONES	44
XIII. BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de inflamación pulpar. _____ 7

Figura 2. Reuterina. _____ 15

Figura 3. Estructura Química de los poloxámeros. _____ 18

Figura 4. Extracción de L. reuteri a partir de tabletas orales ProDentis. _____ 26

Figura 5. Colocación de las placas inoculadas con L. reuteri en sistema de incubación anaeróbica en bolsas GasPak Ez. _____ 27

Figura 6. Lactobacillus reuteri extraído de tabletas orales ProDentis. _____ 29

Figura 7. E. faecalis estandarizado a 0.5 McFarland. _____ 29

Figura 8. Coloación de la solución en gel de L. reuteri en discos de papel blanco estériles. _____ 30

Figura 9. Discos de papel del sistema 1 y control 3 a las 24 h de incubación. ____ 36

Figura 10. Promedio de halo de inhibición bacteriana de los grupos control ____ 39

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Resultados de zona de inhibición bacteriana.</i>	35
<i>Tabla 2. Analisis de varianza de una sola vía.</i>	37
<i>Tabla 3. Pruebas post hoc Tukey de los sistemas 1-4.</i>	37
<i>Tabla 4. Pruebas post hoc Tukey del control 2.</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	Infusión cerebro-corazón
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca(OH)₂	Hidróxido de calcio
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
IgA	Inmunoglobulina A
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-1α	Interleucina-1 α
<i>L. reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
ml	Mililitros
MRS	De Man, Rogosa y Sharpe
NaOCl	Hipoclorito de sodio
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
P407	Poloxámero 407

LISTA DE ABREVIATURAS

TIMP-1	Inhibidor tisular de la metalopeptidasa
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TSA	Trypticaseína de soya
UFC	Unidades formadoras de colonias
μL	Microlitros

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La infección endodóntica persistente tiene la particularidad de ser causada por microorganismos que de alguna manera han resistido los tratamientos antimicrobianos, siendo la más difícil de erradicar y por lo tanto requiere de técnicas de desinfección complementarias como la medicación intraconducto. El Ca(OH)_2 ha sido el medicamento de elección; a pesar de poseer múltiples beneficios, se ha demostrado que presenta ineffectividad contra microorganismos como el *E. faecalis*, por lo cual basados en investigaciones recientes se sugiere el uso de solución a base de probióticos orales como coadyuvante a la erradicación de la infección endodóntica. **OBJETIVO:** Evaluar el potencial antimicrobiano de una solución en gel a base de *L. reuteri* en comparación con el Ca(OH)_2 utilizados como medicación intraconducto. **METODOLOGÍA:** Se evaluó la capacidad antimicrobiana de tres concentraciones de *L. reuteri* combinado con P407 y Ca(OH)_2 contra *E. faecalis* mediante el método de difusión en discos utilizando placas petri y agar Müller-Hinton. Se evaluó la zona de inhibición bacteriana en periodos de 24, 48, 72, 96 y 168 horas. **RESULTADOS:** Visualmente se puede observar que en los grupos control en los que se utilizó la solución a base de *L. reuteri* no existió inhibición significativa en ninguno de los tiempos de incubación, tampoco existió diferencia significativa en los grupos evaluados de la solución en gel de *L. reuteri* independientemente de la concentración utilizada. **CONCLUSIONES:** El uso de solución en gel a base de *L. reuteri* posee poco o nulo efecto antimicrobiano en comparación al uso de Ca(OH)_2 cuando son utilizados como medicación intraconducto.

I. ABSTRACT

INTRODUCTION: Persistent endodontic infection has the particularity of being caused by microorganisms that have somehow resisted antimicrobial treatments, being the most difficult to eradicate and therefore requiring complementary disinfection techniques such as intracanal medication. Ca(OH)_2 has been the medication of choice; Despite having multiple benefits, it has been shown to be ineffective against microorganisms such as *E. faecalis*, which is why based on recent research, the use of a solution based on oral probiotics is suggested as an adjuvant to the eradication of endodontic infection. **OBJECTIVE:** To evaluate the antimicrobial potential of a gel solution based on *L. reuteri* in comparison with Ca(OH)_2 used as intracanal medication. **MATERIALS AND METHODS:** The antimicrobial activity of three concentrations of *L. reuteri* combined with P407 and Ca(OH)_2 against *E. faecalis* was evaluated by the disk diffusion assay using petri dishes and Müller-Hinton agar. The zone of inhibition was evaluated in periods of 24, 48, 72, 96 and 168 hours. **RESULTS:** Visually, we can observe that in the control groups in which the *L. reuteri*-based solution was used, there was no significant inhibition at any of the incubation times, nor was there a significant difference in the groups evaluated with the *L. reuteri* gel solution regardless of the concentration used. **CONCLUSIONS:** The use of gel solution based on *L. reuteri* has little or no antimicrobial effect compared to the use of calcium hydroxide when used as intracanal medication.

II. INTRODUCCIÓN

La Asociación Americana de Endodoncistas define a la endodoncia como la rama de la odontología encargada de la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental humana y los tejidos perirradiculares, la cual tiene como principal objetivo la prevención y tratamiento de la periodontitis apical, es decir, el restablecimiento de la salud periodontal en caso de verse afectada, y por consiguiente la preservación del órgano dentario afectado (1). Al procedimiento para lograr este objetivo se le denomina “tratamiento de conductos radiculares”. En 1985 Ingle señaló que para lograr un tratamiento de conductos exitoso se debe cumplir con la llamada “triada endodóntica” que se compone de asepsia, preparación biomecánica y sellado apical de todos los conductos preparados. Cada uno de estos pasos tiene un alto impacto en el pronóstico de la terapia endodóntica, siendo la asepsia o desinfección la encargada de la disminución de la carga bacteriana del sistema de conductos, la cual es la etiología principal de la periodontitis apical. Ésta última ocasionada por afecciones pulpares irreversibles o a la pérdida de la vitalidad pulpar consiguiente de múltiples factores entre los que se encuentra la caries (2).

2.1. CARIES

Se conoce como caries a una enfermedad dinámica multifactorial, crónica y progresiva, mediada por biofilm bacteriano que resulta en la pérdida de tejidos duros dentales (3). La caries tiene su inicio cuando existe una irritación a los tejidos dentales consiguiente de la interacción de microorganismos oportunistas que forman parte de la microbiota oral con una superficie dental en estado de susceptibilidad; esta interacción da como resultado lo que se conoce propiamente como lesión cariosa, que se caracteriza por tener un desarrollo progresivo que comienza con la desmineralización del esmalte o el cemento, debido a los ácidos que son producidos por las bacterias después del metabolismo de los carbohidratos consumidos en la dieta del individuo (4). Esta enfermedad se caracteriza por el daño

irreversible de las estructuras dentarias en sus estadíos avanzados y de no ser tratada o eliminada a tiempo puede afectar al tejido más profundo del órgano dentario: la pulpa, la cual recibe los estímulos externos y reacciona a ellos defendiéndose produciendo inflamación e iniciando así procesos pulpares que en un momento dado se tornan irreversibles y son caracterizados por la presencia de dolor espontaneo, dolor nocturno, dolor referido y/o sensibilidad térmica que eventualmente conllevan a una necrosis pulpar si la irritación permanece constante (5).

2.2. NECROSIS PULPAR

La necrosis pulpar o pérdida de la vitalidad pulpar se produce como secuela a las lesiones cariosas, a traumatismos, a afecciones periodontales o a procedimientos dentales iatrogénicos, así como a la eliminación de la pulpa por tratamiento endodóntico (4).

Cuando la pulpa se encuentra en estado necrótico se vuelve indefensa a la invasión microbiana y posibilita que los microorganismos oportunistas presentes en la microbiota oral ingresen a la pulpa cameral por distintas vías como: exposición directa por presencia de lesiones cariosas, a través de tubulillos dentinarios permeables o a través fracturas en el cemento y el esmalte. La necrosis puede ser parcial o total, una vez que las bacterias han entrado al sistema de conductos radiculares, comenzaran a esparcirse por todo el espacio ocupado por la pulpa; el tejido necrótico actúa como fuente de nutrientes para las bacterias, las cuales fagocitan el tejido eliminando la pulpa en su totalidad. Una vez establecidos los microorganismos comenzará la generación de un proceso inflamatorio crónico que por lo regular tiene lugar alrededor del ápice dental, conocido como periodontitis apical (6).

2.3. PERIODONTITIS APICAL

La periodontitis apical es reconocida como una enfermedad inflamatoria de etiología polimicrobiana dominada por bacterias anaerobias en la que se ven afectados los tejidos perirradiculares debido a la ausencia de defensas por parte del sistema inmunológico del huésped después de que se ha producido una necrosis pulpar (7). Sundqvist mencionaba las bacterias que normalmente habitan en la cavidad oral, es decir, la microbiota oral, son capaces de invadir el conducto radicular durante y posterior a una necrosis pulpar para participar en la infección de los conductos y finalmente alcanzar los tejidos perirradiculares, ocasionando inflamación como respuesta del organismo (8).

Los principales microorganismos implicados en la patogenia de la periodontitis apical son las bacterias; sin embargo, también se ha establecido la presencia de hongos, arqueas y virus. La mayoría de las bacterias implicadas suelen ser patógenos oportunistas pertenecientes a la microbiota oral que se aprovechan de los cambios que se producen cuando existe algún desequilibrio en el pH de la cavidad oral. Las bacterias comensales se convierten en patógenos oportunistas y provocan infecciones endógenas; una vez colonizado el conducto radicular en estado necrótico, se producen daños en los tejidos perirradiculares que dan lugar a cambios inflamatorios que pueden iniciar incluso antes de que el proceso de necrosis abarque la totalidad del tejido pulpar, es decir antes de llegar el tercio apical de la raíz afectada (7).

Los factores de virulencia bacterianos juegan un papel crucial para el desarrollo de la enfermedad, pueden ser relacionados a los productos segregados como las endotoxinas, exotoxinas, proteínas de shock térmico y productos finales del metabolismo. La periodontitis apical puede ser crónica o aguda, la primera se asocia a una baja virulencia de la población bacteriana implicada, pero representa una fuente persistente de agresión para los tejidos y suele estar relacionada con la organización de las bacterias a manera de biopelículas. La infección aguda se debe a la alta virulencia de las bacterias implicadas, puede ser a consecuencia de la sinergia entre especies y suelen estar relacionadas con bacterias en estado

planctónico en grandes cantidades y que no pueden ser contrarrestadas por el descenso de las defensas del huésped (4).

2.3.2. Bacterias planctónicas

Las bacterias en estado planctónico son asociadas a infecciones agudas, dado que se ha demostrado que tienen alta virulencia debido a la posibilidad de actuar en sinergismo cuando están presentes varias especies bacterianas. El estado planctónico hace alusión a bacterias que se encuentran flotando o nadando libremente dentro de un espacio, en este caso dentro del conducto radicular (9).

2.3.1. Biopelícula

La biopelícula o biofilm es un estado de organización bacteriano cuyo crecimiento inicia con la fijación de una bacteria planctónica a una superficie que se toma como sustrato. Una vez adherida, los microorganismos comienzan a proliferar hasta convertirse en una estructura compleja y por lo tanto un biofilm maduro con diferentes necesidades ecológicas y patogenias. Este tipo de unión brinda protección a las bacterias y las vuelve resistentes a los factores de defensa del huésped, al igual que a algunos agentes antimicrobianos utilizados para la desinfección en el tratamiento de infecciones. Es una fuente persistente de agresión, por lo que para que la desinfección sea exitosa, se debe realizar la remoción total del biofilm bacteriano. Se ha demostrado que las bacterias en este estado son de 100-1000 veces más resistentes que las bacterias en estado planctónico (10).

2.4. INFECCIÓN ENDODÓNTICA

Las infecciones endodónticas se pueden clasificar según su localización anatómica en infección intrarradicular e infección extrarradicular. La infección intrarradicular es causada por microorganismos que colonizan el interior del sistema de conductos radiculares (Figura 1) y son subdivididas dependiendo el momento en el que estos acceden al sistema en: infección primaria refiriéndose a la colonización inicial de

II. INTRODUCCIÓN

una pulpa virgen que no ha sido invadida o tratada previamente, infección secundaria cuando los microorganismos acceden al conducto radicular en algún momento durante o posterior a la intervención profesional e infección persistente, la cual tiene la particularidad de ser causada por microorganismos que estuvieron presentes desde la infección primaria y que de alguna manera resistieron los tratamientos antimicrobianos que se utilizan en la terapia endodóntica, ésta última siendo la más difícil de erradicar y por lo tanto requiere de técnicas de desinfección complementarias que promuevan una mayor distribución de los agentes irrigantes en las zonas de difícil acceso, como la medicación intraconducto. Cuando los microorganismos se encuentran adheridos a la pared externa de la raíz dentaria se denomina infección extrarradicular, como su nombre lo sugiere, presenta invasión microbiana en el exterior de la raíz, ocasionando inflamación en los tejidos perirradiculares; puede ser una secuela a la infección intrarradicular o surgir de manera independiente. Las infecciones endodónticas están compuestas por una comunidad polimicrobiana en la que predominan especies gram positivas anaerobias facultativas entre las que se destaca el *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), esta especie bacteriana se encuentra con mayor frecuencia en tratamientos realizados por primera vez, es decir, en infecciones primarias o en casos de recidiva (infección persistente), esta bacteria ha sido encontrada tanto en el interior del conducto como en lesiones periapicales (7).

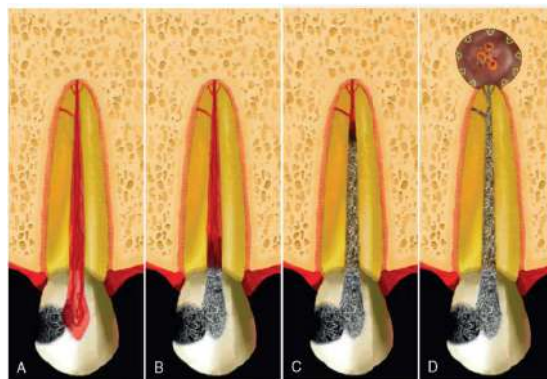


Figura 1. Proceso de inflamación pulpar.

Proceso de inflamación, necrosis e infección de la pulpa a partir de la exposición a la caries, hasta la formación de una periodontitis apical(9).

2.4.1. *Enterococcus faecalis*

El *Enterococcus* es un grupo de bacterias en forma de cocos, gram-positivas, anaerobias facultativas, que forman parte de la microbiota oral, del tracto gastrointestinal humano y del tracto genital femenino. El *E. faecalis*, es una especie bacteriana que se encuentra con mayor frecuencia en casos de fracaso endodóntico, asociando su presencia a una de las principales causas del fracaso en el tratamiento endodóntico primario; se ha descubierto que ésta bacteria ha desarrollado mecanismos de supervivencia a los tratamientos químicos antimicrobianos y que posee numerosos factores de virulencia como la producción de sustancias de agregación, proteínas de superficie, gelatinasa, producción de superóxido extracelular, polisacáridos capsulares y resistencia a varios antibióticos, además de características como la resistencia al pH altamente alcalino y de tener gran capacidad de adaptación, lo cual la hace resistente a altas temperaturas, altas concentraciones de sal, ácido e incluso a la ausencia de nutrientes. Las posibles causas de la presencia de este microorganismo en fracasos endodónticos sugieren que el *E. faecalis* posee la habilidad de colonizar e infectar los tubulillos dentinarios, por lo que su eliminación y desinfección químico-mecánica durante el tratamiento de conductos primario se vuelve compleja dada la imposibilidad de acceder a dichos espacios anatómicos tan reducidos, además estas bacterias presentan la habilidad de unirse al colágeno y representan un papel importante en el desarrollo del biofilm bacteriano, lo cual aumenta la resistencia a los antibióticos y a la fagocitosis. Otra posible causa es la potencial resistencia de esta bacteria a la medicación intraconducto más utilizada en la odontología actual: el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), lo que permite a estos microorganismos permanecer en estado quiescente (11).

2.5. AGENTES IRRIGANTES

La desinfección es uno de los principios fundamentales establecidos por el Dr. Ingle en la llamada “triada endodóntica”, esta consiste en la disminución de la carga bacteriana del interior del sistema de conductos mediante el uso de soluciones

especiales conocidas como agentes irrigantes. Irrigación se define como el lavado de una herida o cavidad corporal con agua o un líquido medicado, a los cuales se les da el nombre de agentes irrigantes, estos tienen como objetivo dentro de la terapia endodóntica la eliminación de residuos, lubricación del conducto y eliminación del tejido orgánico e inorgánico (9). Algunas de las características deseadas en un agente irrigante son: tener amplio espectro antimicrobiano y una alta eficacia contra biopelículas de microorganismos aerobios y facultativos, disolución del tejido pulpar necrótico, inactivación de endotoxinas, eliminación del barrillo dentinario o su posterior disolución, no ser sistémicamente tóxico y tener poco o nulo potencial de causar una reacción de anafilaxia. Los agentes irrigantes de mayor uso en la actualidad incluyen el NaOCl, la clorhexidina y soluciones quelantes como el ácido cítrico y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); sin embargo, como se ha establecido con anterioridad, existen tipos de infecciones endodónticas y formas de organización bacteriana que limitan la utilización de estas sustancias, pues su uso exclusivo es incapaz de eliminar por completo el factor causal de la periodontitis apical, por lo tanto se requieren de técnicas complementarias a la irrigación que cumplan con superar los limitantes que presentan los irrigantes de mayor uso en endodoncia, la técnica más estudiada que promueve una desinfección prolongada es la conocida como medicación intraconducto (12,13).

2.6. MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

La medicación intraconducto es una técnica empleada para combatir los microorganismos remanentes de la infección endodóntica colocando una sustancia con propiedades antibacterianas en el espacio de los conductos radiculares. Se coloca para que actúe como curativo de demora hasta la finalización del tratamiento de conductos; para realizarla se utilizan medicamentos con propiedades curativas que se encargan de reducir el dolor y la inflamación, eliminar el exudado apical, controlar la reabsorción radicular inflamatoria y prevenir la contaminación entre citas

previo al sellado final. Actualmente el estándar de oro de la medicación intraconducto es el Ca(OH)_2 utilizado en endodoncia desde 1920 (14).

2.6.1. HIDRÓXIDO DE CALCIO

El Ca(OH)_2 ha sido el medicamento de elección empleado para medicación intraconducto por su actividad biológica y antimicrobiana cuando la desinfección físico-química no es suficiente debido a características anatómicas de los órganos dentarios, como a la complejidad en la anatomía del sistema de conductos radiculares (presencia de istmos, irregularidades) o en casos de infecciones endodónticas severas para el control y disminución de la carga bacteriana (15). Se ha sugerido el empleo del Ca(OH)_2 como curativo de demora con el objetivo de eliminar bacterias remanentes posterior a la instrumentación, reducir el dolor, eliminar el exudado apical, controlar la reabsorción radicular inflamatoria y prevenir la contaminación previa al sellado final (16). El Ca(OH)_2 es reconocido hasta la fecha como el estándar de oro para medicación intraconducto, es un medicamento antibacteriano que actúa por disociación iónica de los iones Ca^{2+} y OH^- que modifica los lipopolisacáridos de la pared bacteriana haciéndolos menos antigénicos, además posee propiedades alcalinas (pH alto). Se han utilizado distintos vehículos para su manejo clínico, los cuales se pueden clasificar en oleosos, viscosos y acuosos, según su consistencia; el vehículo ideal debe ser capaz de permitir la disociación iónica de manera gradual y lenta sin modificar el pH alcalino, además debe tener la viscosidad adecuada que permita la interacción de las partículas. Entre los vehículos más utilizados para este fin se encuentran el agua destilada, la solución salina, anestésicos dentales, glicerina, polietilenglicol, aceite de oliva, e incluso se ha sugerido el uso de clorhexidina al 2% o yoduro de potasio para potencializar el efecto antimicrobiano del Ca(OH)_2 , no obstante, los resultados no han sido del todo concluyentes (17,18). Algunos estudios han demostrado la inefectividad del medicamento frente a microorganismos como el *E. faecalis* ya que éste tiene la capacidad de sobrevivir un medio ambiente con pH altamente alcalino por lo cual, es capaz de permanecer en el espacio intrarradicular aun cuando se ha empleado la medicación intraconducto y al contrario, verse beneficiado en su actividad

de adherencia cuando el Ca(OH)_2 eleva el pH de la zona infectada aumentando la capacidad del *E. faecalis* de unirse al colágeno (19).

El Ca(OH)_2 tiene poco o ningún efecto sobre la intensidad o la gravedad del dolor posoperatorio después del tratamiento de endodoncia. Se estudió el efecto del Ca(OH)_2 sobre las citocinas proinflamatorias y se concluyó que conduce a la desnaturalización de mediadores proinflamatorios como la interleucina-1 α (IL-1 α), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Además, no se recomienda la sobreextensión deliberada porque la extrusión periapical de Ca(OH)_2 puede tener efectos perjudiciales. Informes sobre necrosis ósea y respuestas inflamatorias continuas en perforaciones mecánicas reparadas, efectos neurotóxicos de los selladores de conductos radiculares, citotoxicidad en cultivos celulares, epitelio dañado con o sin atípico celular cuando se aplica sobre bolsas en las mejillas de hámsters, daño celular después de un vendaje temprano con Ca(OH)_2 de dientes avulsionados y necrosis de la encía y la mucosa bucal después de una sobreextensión perirradicular causada por una quemadura alcalina, por lo que en los últimos años ha surgido la necesidad de buscar una alternativa de igual o mayor efectividad, pero con la menor cantidad de efectos adversos. Derivado de estas limitaciones y potenciales efectos adversos se han buscado alternativas que ofrezcan un mayor potencial antimicrobiano en infecciones endodónticas persistentes (20).

2.7. PROBIÓTICOS

El control de la resistencia bacteriana a los antibióticos es uno de los principales tópicos que conciernen en la actualidad a la Organización Mundial de la Salud (OMS), por lo cual se ha encaminado a la búsqueda de alternativas terapéuticas que sustituyan al uso convencional de antimicrobianos; con el reciente auge en los estudios sobre el microbioma humano, que se define como el componente microbiano normal y reconocido de todos los seres humanos y animales que es necesario para preservar la salud, surge la idea de que los probióticos pueden ser coadyuvantes para el mantenimiento de un equilibrio en la salud endodóntica. La

II. INTRODUCCIÓN

OMS define a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped” modulando la respuesta inmunoinflamatoria e influyendo en la estructura y función de la microbiota humana. El uso de probióticos fue inicialmente utilizado como auxiliar en padecimientos del tracto gastrointestinal por sus efectos inmunomoduladores e inhibidores de la inflamación, se ha demostrado que algunas especies tienen la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal a manera de biofilm y producir sustancias antimicrobianas para competir con los microorganismos patógenos por los sitios de adherencia y los sustratos disponibles. Los probióticos tienen la capacidad de mejorar el estado del paciente en trastornos como diarrea, gastroenteritis, enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), cáncer, digestión inadecuada de lactasa, alergia pediátrica, hiperlipidemia, enfermedad hepática e infección por *Helicobacter pylori*, infecciones genitourinarias, etc. Su uso en odontología surge de la hipótesis de que su mecanismo de acción en la cavidad oral puede ser análogo al descrito para el intestino, por lo que en los últimos años se han realizado estudios que comprueban su eficacia en distintas áreas de la odontología; las especies de probióticos más estudiadas en la actualidad son del género *Lactobacilli* y *Bifidobacterium* (21,22).

En particular a nivel oral, los probióticos tienen el efecto de reducir la aparición de las lesiones cariosas, prevenir la enfermedad periodontal, reducir la halitosis y combatir las infecciones orales por *Candida*. Su actividad localizada a menudo tiene efectos en todo el organismo al reducir las consecuencias de la inflamación a nivel sistémico. El control de la enfermedad periodontal puede volverse estratégico para la prevención de enfermedades sistémicas relacionadas con procesos de aterosclerosis, enfermedades vasculares y patologías cardíacas (23). Además de poder prevenir la caries, parece ser, según algunos estudios que, a través de su aplicación local en una concentración de 10^8 UFC, los probióticos pueden reducir la concentración de varias bacterias implicadas en la microbiota oral, como *Bacteroides spp*, *Actinomyces spp.*, *Staphylococcus intermedius* y *C. albicans* (24).

II. INTRODUCCIÓN

El uso de probióticos en el área de la endodoncia aún requiere de mayor cantidad de estudios que justifiquen su empleo; sin embargo, en la literatura encontrada hasta la actualidad existe un ensayo preliminar *in vitro* realizado por Cosme-Silva en el que indicó que los probióticos de especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* pueden ser efectivos para la prevención del crecimiento de *E. faecalis* y *C. albicans*, por lo que propone el uso de probióticos como medicación intraconducto en casos de periodontitis apical persistente, validando su utilización como una especie de terapia de reemplazo microbiano en la que se actúa a través de resistencia a la colonización e inmunomodulación (25). En lugar de que el objetivo del tratamiento sea la eliminación completa de los microorganismos existentes en la cavidad pulpar mediante el uso de los irrigantes endodónticos convencionales, se sugiere que la colocación intraconducto de probióticos eliminaría la flora patógena endodóntica de una manera menos tóxica para el organismo. Esta teoría surge de los hallazgos actuales y emergentes en microbiología, que establece que un enfoque razonable y más biocompatible para abordar y tratar las infecciones bacterianas debería buscar el mantener un estado de equilibrio dentro del microbioma humano. Además de eliminar y superar a los patógenos que entraron originalmente por el proceso de caries, los organismos probióticos no solo podrían eliminar las bacterias que causan enfermedades, sino que también podrían evitar que se restablezcan después de que se haya completado el tratamiento, lo que reduce la incidencia de fallas endodónticas (24,26,27).

Se han propuesto algunas teorías sobre el mecanismo de acción de los probióticos, incluyendo la producción de sustancias antimicrobianas en antagonismo con los agentes patógenos, compitiendo por los factores de crecimiento y nutrientes, previniendo la adhesión celular, invasión y modulación de acciones locales y sistémicas mediante la disminución en la producción de Interleucina-1 beta (IL-1 β), TNF- α , IL-8 y aumentando la producción de Inmunoglobulina A (IgA). Se ha demostrado en estudios previos que algunas especies de *Lactobacillus* han sido capaces de reducir los niveles orales de *Staphylococcus mutans*, patógeno comúnmente asociado al desarrollo de lesiones cariosas (23,28,29).

2.7.1. *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es un grupo de bacterias anaerobias facultativas, catalasa negativas, gram-positivas y no formadoras de esporas que con frecuencia crecen mejor bajo condiciones microaerófilas. Su característica principal es la producción de ácido láctico mediante la fermentación de carbohidratos (30). En general, los lactobacilos son considerados como especies de probióticos y pueden ser encontrados en comidas fermentadas como el yogurt. Estos microorganismos confieren beneficios a la salud como la mejora y mantenimiento del sistema inmune, producción de sustancias antibacterianas e intensificación de la función de barrera de las mucosas. Existen 170 tipos de lactobacilos con diferentes funciones, siendo de interés para este estudio los *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*)(31).

2.7.1.1. *Lactobacillus reuteri*

L. reuteri es una bacteria probiótica con capacidades antibacterianas e inmunoinflamatorias cuando son utilizadas para el tratamiento de infecciones. Existen dos cepas de *L. reuteri*: DSM 17938 cuyo producto metabólico más importante es la reuterina formadora de antibióticos que inducen al estrés oxidativo en los patógenos y la ATCC PTA 5289 caracterizada por tener propiedades antiinflamatorias que induce a la producción de IL-8 e IL-1 β (32).

La casa comercial Biogaia, desarrolló comprimidos que contienen la bacteria productora de ácido láctico *L. reuteri* (Biogaia, Estocolmo, Suecia), sus estudios científicos destacan que 2 x 10⁸ UFC de *L. reuteri* por día puede producir moléculas antimicrobianas, como ácidos orgánicos, etanol y reuterina. Debido a su actividad antimicrobiana, es capaz de inhibir la colonización de microbios patógenos y remodelar la composición de la microbiota comensal en el huésped. En segundo lugar, *L. reuteri* puede beneficiar al sistema inmunitario del huésped. Por ejemplo, algunas cepas de *L. reuteri* pueden reducir la producción de citocinas proinflamatorias mientras promueven el desarrollo y la función de las células T reguladoras. Posee múltiples mecanismos de acción, entre ellos la síntesis y liberación de reuterina (Reuterina), sustancia que posee acción antibacteriana de

amplio espectro, contra bacterias gram-positivas, gram-negativas, hongos (*C. albicans*) y protozoos, el bloqueo de los sitios de unión de las bacterias patógenas y su inhibición sin alterar la composición de la microbiota comensal, la disminución en la producción de TNF- α e IL-8, y el aumento en los niveles del inhibidor tisular de la metalopeptidasa (TIMP-1) (33,34).

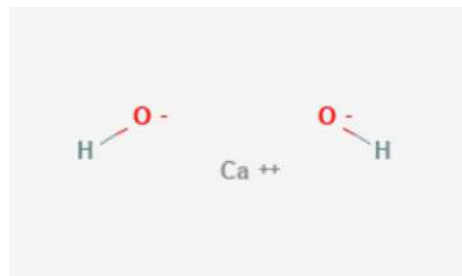


Figura 2. Reuterina.

Estructura química de la reuterina (35).

Además de las bacteriocinas y los ácidos orgánicos producidos por la mayoría de los géneros de probióticos, algunas cepas de *L. reuteri* también producen un compuesto antimicrobiano excepcionalmente activo, la reuterilina, como su metabolito principal. La reuterilina difiere de la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico, porque la reuterilina es en realidad un derivado del ácido tetrámico que posee actividad tanto bacteriostática como bactericida contra muchas bacterias grampositivas y gramnegativas, incluidas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* y *Clostridium difficile*. Se ha informado que la reuterilina mostró actividad bactericida dependiente de la dosis, incluida la lisis celular, contra varias bacterias. *E. faecalis* es la cepa indicadora más sensible para la reuterilina, con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 0,05 mg/L. Aunque el mecanismo preciso de la reuterilina aún no está claro, se cree que la propiedad antimicrobiana era un resultado del daño a la membrana citoplasmática microbiana. La concentración más efectiva de *L. reuteri* fue 1×10^8 CFU/mL para *E. faecalis* (79.2% después de 1 hora). Para reducir significativamente

el crecimiento de biopelículas de *C. albicans*, la concentración más eficaz para *L. reuteri* fue de 1×10^4 CFU/mL (62.5 % en 1 hora) (36).

Con base en las investigaciones previas, Widyarman *et al.* evaluaron los efectos de la utilización de reuterina pura obtenida de probióticos de la marca comercial Prodentis (Biogaia, Stockholm, Suecia) como solución irrigante realizando estudios *in vivo* y *ex vivo* de biofilm de *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, and *C. albicans*. Como ya se mencionó, la reuterina es un componente producido por *L. reuteri* que posee un amplio espectro antimicrobiano, su mecanismo de acción es mediante la inducción de estrés oxidativo a los patógenos impidiendo que éstos proliferen. Los resultados que se obtuvieron sobre las cuatro bacterias evaluadas fueron comparables a los obtenidos a un grupo control en el que se utilizó el irrigante convencional NaOCl tanto para las bacterias en estado planctónico como para el biofilm, por lo que el autor establece que la reuterina concentraciones de al menos 100 µg/L puede ser una alternativa igual de eficaz que el NaOCl por sus propiedades antimicrobianas y antibiofilm; sin embargo, menciona que se requieren estudios adicionales que verifiquen si es capaz de disolver tejido necrótico (37).

Una vez establecidos los potenciales beneficios de la probióticos para la salud endodóntica, Ashok-Bohora sugiere su utilización como medicación intraconducto, fundamentando que debido a la complejidad en la anatomía radicular es imposible acceder a la totalidad del conducto con las técnicas actuales de desinfección e instrumentación, por lo que lejos de llegar a una completa esterilidad del sistema de conductos, lo mejor a lo que se puede aspirar con el tratamiento endodóntico convencional es a una disminución en la carga bacteriana. Basándose en investigaciones previas de Microbiología y Probióticos en los que se define al microbioma humano como un componente microbiano normal que se necesita para conservar la salud, Ashok-Bohora propone que los dientes son parte del microbioma humano, por lo que deben existir microorganismos benéficos que estén relacionados con la salud endodóntica y ésta podría alcanzarse mediante la administración de probióticos que actúen modulando la respuesta inflamatoria produciendo sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, peróxidos, inhibiendo

la invasión epitelial de patógenos o compitiendo con otros patógenos potenciales como una especie de terapia de reemplazo microbiano; en un artículo de revisión menciona las limitaciones que posee el uso de medicación intraconducto convencional con Ca(OH)_2 , el empleo de pastas antibióticas o corticoesteroides planteando la necesidad de alternativas novedosas que den como resultado un mayor éxito a largo plazo en el tratamiento endodóntico (26), por lo que posteriormente realizó un estudio preliminar en el que se probaba la eficacia de ciertas cepas de probióticos contra patógenos endodónticos difíciles de erradicar mediante tratamiento convencional: *E. faecalis* y *C. albicans*. Introdujo probióticos de especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium bifidum* en cultivos bacterianos de *E. faecalis* y *C. albicans* en estado planctónico mediante placas de agar y pruebas de antagonismo diferido, además se comprobó su efectividad contra estas mismas bacterias en estado de biofilm llevando los probióticos directamente al interior del conducto radicular con Poloxámero 407 (P407) al 30% como vehículo. Ambos grupos tuvieron resultados favorables cuando se evaluó la actividad antimicrobiana en las placas de agar, pero no se mostró ningún efecto en el método de antagonismo diferido. En cambio, cuando se suministraron directamente en el conducto se reveló que los probióticos crearon restricciones para el crecimiento de ambos patógenos endodónticos, por lo que el autor sugiere un cambio de paradigma en el que la búsqueda no sea la completa erradicación de los microorganismos en el sistema de conductos, si no la restauración de la microbiota normal (27).

2.8. POLOXÁMERO 407

Para la aplicación localizada de soluciones a base de probióticos en el interior del conducto radicular, se ha buscado un vehículo que posea las características adecuadas para proporcionar estabilidad, viabilidad y liberación sostenida; ensayos *ex vivo*, han sugerido el uso de P407 (Pluronic F-127).

Los poloxámeros son copolímeros tribloque no iónicos utilizados como portadores de distintos fármacos. Su estructura química se destaca por tener un grupo

II. INTRODUCCIÓN

hidrófobo en la parte central de la molécula y grupos hidrófilos en los extremos (Figura 3). Estos polímeros muestran una característica de gran utilidad para su uso como formulación tópica a la cual se le denomina termogelificación reversible, que los vuelve solubles en soluciones acuosas a bajas temperaturas, pero se gelifican cuando se administran a temperatura corporal, por lo que son excelentes candidatos para el depósito de gel *in situ*, ya que se prolonga la farmacocinética del fármaco (38). Específicamente el P407 (Pluronic F-127) ha sido objeto de numerosos estudios gracias a su buena capacidad solubilizante, baja toxicidad, buenas características de liberación del fármaco y compatibilidad con numerosas biomoléculas y excipientes químicos. En el área odontológica ha sido empleado como vehículo para dentífricos fluorados y en productos de gel para el tratamiento de encías y sensibilidad dentaria (39). Las características antes mencionadas vuelven al P407 el vehículo ideal para la transportación de probióticos al interior del conducto radicular de tal manera que permanezcan en él por días consecuentes hasta la culminación del tratamiento en una siguiente cita.

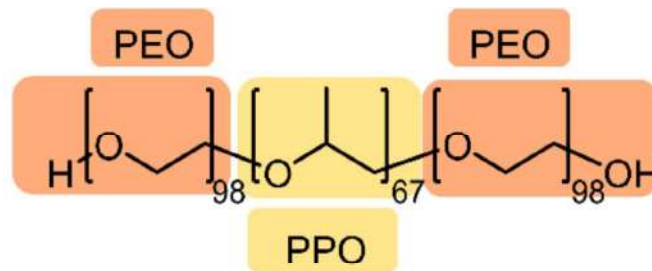


Figura 3. Estructura Química de los poloxámeros.

Estructura química de los poloxámeros, característica por presentar un grupo hidrófobo en la parte central de la molécula y grupos hidrófilos en los extremos (38).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La medicación intraconducto es un auxiliar a la irrigación que se emplea en casos de infecciones endodónticas difíciles de erradicar. En la actualidad el medicamento más utilizado para este fin es el $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Sin embargo, se ha reportado que posee algunas limitaciones sobre microorganismos asociados al fracaso endodóntico como el *E. faecalis*; por lo que surge la necesidad de búsqueda de alternativas que aporten un mayor efecto antimicrobiano de acción prolongada en el interior del conducto radicular.

En el presente proyecto de investigación se plantea la aplicación de probióticos orales *L. reuteri* como medicación intraconducto para evaluar su efecto contra *E. faecalis*, por lo cual surge la siguiente pregunta de investigación: ¿La solución en gel a base de *L. reuteri* proporciona mayor actividad antimicrobiana contra el *E. faecalis* en comparación al $\text{Ca}(\text{OH})_2$ cuando es utilizada como medicación intraconducto?

IV. JUSTIFICACIÓN

El objetivo principal de la medicación intraconducto es la disminución de la carga microbiana contenida en los conductos radiculares mediante el uso de medicamentos de acción prolongada; el Ca(OH)_2 es el medicamento de elección para este fin. Sin embargo posee algunas limitaciones como su baja efectividad contra los mecanismos de patogenicidad del *E. faecalis*, además de presentar desventajas relacionadas a la extrusión del material.

Recientemente se ha estudiado el uso de probióticos *L. reuteri* para la erradicación del biofilm endodóntico, por lo que el presente trabajo de investigación pretende analizar el comportamiento de estos microorganismos vivos cuando son colocados en el interior del conducto para determinar las ventajas que poseen frente al Ca(OH)_2 y su acción contra el patógeno de mayor incidencia en el fracaso endodóntico: *E. faecalis*.

V. HIPÓTESIS

5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La solución en gel a base de *L. reuteri* posee actividad antimicrobiana efectiva para la erradicación de *E. faecalis* cuando es utilizada como medicación intraconducto.

5.2. HIPÓTESIS NULA (H0)

Al menos una de las concentraciones evaluadas de la solución en gel de *L. reuteri* no presenta diferencia estadísticamente significativa con el Ca(OH)_2 cuando son utilizados como medicación intraconducto para la erradicación del patógeno endodóntico de mayor incidencia en infecciones intrarradiculares persistentes: *E. faecalis*, con un nivel de confianza del 95%.

5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)

Al menos una de las concentraciones evaluadas de la solución en gel de *L. reuteri* presenta diferencia estadísticamente significativa con el Ca(OH)_2 cuando son utilizados como medicación intraconducto para la erradicación del patógeno endodóntico de mayor incidencia en infecciones intrarradiculares persistentes: *E. faecalis*, con un nivel de confianza del 95%.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de la solución en gel a base de *L. reuteri* en comparación con el Ca(OH)_2 utilizados como mediación intraconducto.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer la cepa *L. reuteri* a partir de tabletas orales ProDentis.
2. Realizar tres distintas concentraciones de la solución en gel a base de *L. reuteri* estandarizadas en unidades McFarland.
3. Evaluar la capacidad antimicrobiana de cada concentración de *L. reuteri* en combinación con P407 mediante ensayos *in vitro* utilizando el método de difusión en discos contra el patógeno endodóntico *E. faecalis* cultivado en laboratorio.
4. Medir la zona de inhibición bacteriana en periodos de 1, 2, 3, 4 y 7 días para determinar un tiempo de acción adecuado de la solución en gel a base de *L. reuteri*.
5. Comparar los resultados obtenidos con el grupo control al que se colocará mediación intraconducto con Ca(OH)_2 .
6. Realizar análisis estadístico de los resultados obtenidos.

VII. VARIABLES

7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

1. Tipo de medicación (Concentración de la solución a base de *L. reuteri* o $\text{Ca}(\text{OH})_2$)
2. Tiempo (1, 2, 3, 4 y 7 días)

7.2. VARIABLE DEPENDIENTE

Actividad antimicrobiana (Halo de inhibición)

7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES

Se evaluará el efecto antimicrobiano de la solución en gel de *L. reuteri* extraído de tabletas orales ProDentis (Biogaia, Estocolmo, Suecia), comparada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mediante el método de difusión en discos utilizando placas petri y agar Müller-Hinton inoculado con *E. faecalis*. Se evaluará la zona de inhibición bacteriana en periodos de 1, 2, 3, 4 y 7 días.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. TIPO DE ESTUDIO:

Experimental (*in vitro*)

8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO:

Para evaluar la actividad antibacteriana se realizaron ensayos de difusión en discos en los que se evaluaron cuatro concentraciones de solución en gel de *L. reuteri* y cinco grupos control (n=3).

Sistema 1: *L. reuteri* + P407 0.5 McFarland

Sistema 2: *L. reuteri* + P407 1 McFarland

Sistema 3: *L. reuteri* + P407 2 McFarland

Sistema 4: *L. reuteri* 2 McFarland

Control 1: P407

Control 2: Ca(OH)₂

Control 3: Agua estéril

Control 4: Gentamicina

Control 5: Ampicilina

8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL

Se utilizaron tabletas orales ProDentis (Biogaia, Estocolmo, Suecia) de las cuales se extrajo la cepa *L. reuteri* utilizando caldo MRS (HiMedia, Mumbai, India) como medio de cultivo en tubos de ensayo de 10 ml. La bacteria seleccionada para el

análisis antimicrobiano fue una cepa clínica de *E. faecalis* (Laboratorio Zapata: Diagnóstico Microbiológico, Inmunológico y Análisis Clínicos. Tijuana, México), se utilizó como medio de conservación bacteriana Agar de Soya Trypticaseína (TSA, por sus siglas en inglés) de la marca TM Media. Para promover el crecimiento de ambas cepas, se utilizó agar Müller-Hinton (BD Bioxon, México) en cajas petri y una incubadora eléctrica de laboratorio (PRECISION, Virginia, E.U.A.); en el caso de *L. reuteri* se utilizó el sistema de incubación anaeróbica en bolsas GasPak Ez (Becton Dickinson) y como vehículo para obtener la solución se utilizó Poloxámero 407 NF (Pluronic F-127, Specialized Rx, E.U.A.). Se utilizó $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (ViardenLab, México) para comparar la actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* y como grupos control, se optó por utilizar sulfato de gentamicina (CDH), discos de susceptibilidad ampicilina 10 μg (Bio-Rad, Francia) de 6.5 mm diámetro y agua destilada estéril; para dispensar las soluciones en las placas de agar se utilizaron discos de papel filtro cualitativo 413 de 6 mm de diámetro (VWR, Troenmer, E.U.A.) Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad dentro de una cabina de flujo laminar vertical (LABCONCO, Kansas, E.U.A.) e indumentaria de laboratorio adecuada y se utilizó un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific, E.U.A) y cubetas de vidrio de 1/2" de diámetro (Thermo Scientific, E.U.A) para estandarizar las soluciones bacterianas mediante caracterización UV.

8.4. METODOLOGÍA

Evaluación de la zona de inhibición bacteriana

8.4.1. Método de difusión en discos

Para el análisis de la actividad antimicrobiana de la solución en gel de *L. reuteri* se utilizaron pruebas del método de difusión en discos siguiendo la metodología propuesta por Seifelnasr en 2014 (40). Previa asepsia y desinfección del campo operatorio, se inició la preparación del caldo de cultivo MRS, siguiendo las recomendaciones del fabricante, mezclando 22.06 g del medio en 400 ml de agua destilada estéril hasta que el polvo fue completamente disuelto y se obtuvo una mezcla homogénea. Una vez preparado el medio de cultivo, se esterilizó en

autoclave a 121 °C por 15 min y se mantuvo en refrigeración a 4°C para almacenarlo hasta su posterior uso.

8.4.1.1. Extracción de *L. reuteri*

Las cepas de *L. reuteri* fueron extraídas de tabletas orales ProDentis en una cabina de flujo laminar vertical en condiciones de completa esterilidad; se comienza triturando las tabletas con un mortero de vidrio hasta obtener 0.5 y 1.5 g (Figura 4 A) de polvo que fue colocado dentro de dos tubos de ensayo con 10 ml de caldo MRS estéril (Figura 4 B y C), se agitaron con ayuda de un agitador digital vortex (VWR Troenmer, E.U.A.) por 2 minutos hasta que se obtuvo una mezcla homogénea (Figura 4 D). Se dejó reposar las muestras por 30 min a temperatura ambiente para asegurar la rehidratación del polvo y se volvieron a agitar por 2 min. Se incubaron las muestras a 37 °C por 48 h. Una vez obtenido el cultivo, se transfirieron 500 µL de la cepa cultivada con una micropipeta hacia placas petri con agar Müller-Hinton y se esparció con un asa de siembra desplazándola de manera uniforme en el agar. Una vez que se inoculó la bacteria, se colocan las placas petri dentro del sistema de incubación anaeróbica en bolsas GasPak Ez (Figura 5) y se colocan nuevamente en la incubadora a 37 °C por 48 h para promover su crecimiento.

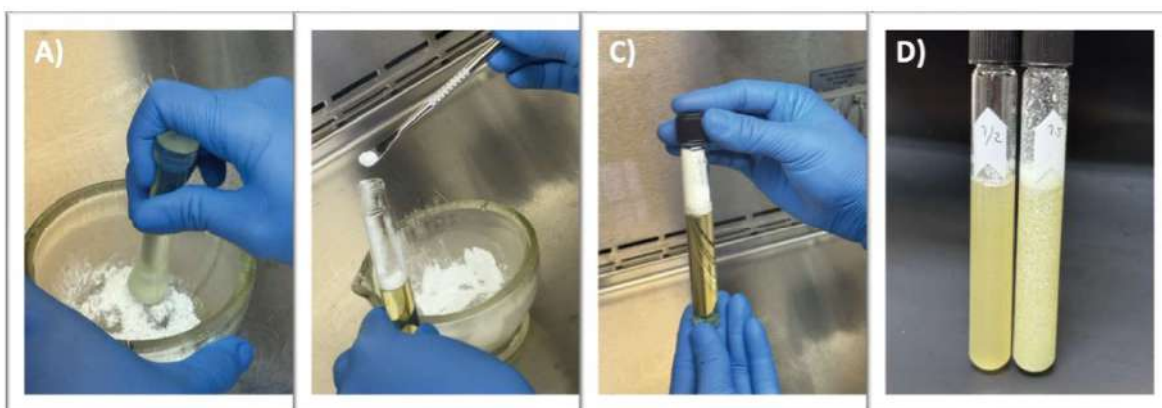


Figura 4. Extracción de *L. reuteri* a partir de tabletas orales ProDentis.

Trituración de 0.5 y 1.5 tabletas. b) Colocación del polvo a tubos de ensayo con 10 ml de caldo MRS estéril c) Polvo completamente colocado dentro del tubo de ensayo d) Mezcla despues de agitarse en vortex.



Figura 5. Colocación de las placas inoculadas con *L. reuteri* en sistema de incubación anaeróbica en bolsas GasPak Ez.

8.4.1.2. Preparación del vehículo

Se inició la preparación disolviendo 30 mg de P407 en 100 ml de caldo MRS frío utilizando un agitador magnético por 30 min. Una vez obtenida la mezcla, se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min; se transfirieron 9 ml del P407 preparado a tubos de ensayo de 10 ml y se conservaron a 4 °C hasta que el cultivo de *L. reuteri* estuvo listo para utilizarse.

8.4.1.3. Crecimiento de *E. faecalis*

La cepa clínica de *E. faecalis* fue transportada en medio infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés); para su crecimiento se tomó con una micropipeta 10 µL de bacteria y se colocó en 9 ml de caldo TSA en tubos de ensayo de 10 ml, se agitó en un vortex digital por 2 min hasta obtener una mezcla homogénea. Después se procedió a realizar el inóculo tomando la bacteria con un isopo y colocándola de manera uniforme en agar Müller-Hinton que fue incubado a 37 °C durante 24 h para promover su crecimiento.

8.4.1.4. Protocolo McFarland

Para la realización de este experimento se tomó como referencia la escala de McFarland, que consiste en comparar de manera visual la turbidez de una solución de bacterias con la turbidez de una solución estandarizada para determinar el número aproximado de microorganismos existentes. La escala va enumerada del 1-10, cada número representando una concentración de unidades formadoras de colonias por ml, en la que 1 McFarland equivale a una concentración de 3×10^8 UFC/ml (41). Para la estandarización de las tres distintas concentraciones de *L. reuteri* se tomó el microorganismo previamente inoculado en agar Müller-Hinton (Figura 6) y se colocó en 10 ml de caldo MRS estéril, se agitó en un vortex hasta obtener una mezcla homogénea, de la cual se tomaron 2 ml con una micropipeta y se transfirieron a cubetas de vidrio de 1/2" de diámetro. Para medir la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro, en el que se midió la intensidad de luz absorbida en función de una longitud de onda de 620 nm comparándolo con soluciones de 0.5, 1 y 2 McFarland previamente preparadas, hasta obtener una absorbancia de la solución de *L. reuteri* similar ($\pm 0.010A$) a la del estándar en cada una de las concentraciones. De igual manera se estandarizó el *E. faecalis* en solución salina estéril a una escala de 0.5 McFarland en función de una longitud de onda de 540 nm (Figura 7).



Figura 6. *Lactobacillus reuteri* extraído de tabletas orales ProDentis.

Observación en microscopio óptico LEICA DM500 posterior a realizar tinción de gram con cristal violeta (Magnificación 100x).



Figura 7. *E. faecalis* estandarizado a 0.5 McFarland.

8.4.1.5. Preparación de la solución en gel de *L. reuteri*

Se transfirieron 9 ml del P407 preparado a tubos de ensayo de 10 ml y se agregó 500 μ L de cada concentración preparada de *L. reuteri*: 0.5 McFarland (Sistema 1),

1 McFarland (Sistema 2) y 2 McFarland (Sistema 3); se agitaron las muestras con un vortex digital hasta obtener una mezcla homogénea que se mantuvo en almacenamiento a 4 °C hasta su posterior uso.

8.4.1.6. *Transportación de la solución en gel de L. reuteri a los medios de cultivo*

Con una micropipeta, se colocaron en discos de papel filtro estériles: 10 µL de cada concentración de la solución en gel de *L. reuteri* (Sistemas 1-3) (Figura 8) 10 µL de *L. reuteri* estandarizado a 2 McFarland sin P407 (Sistema 4) y se utilizaron como grupos control: 10 µL de P407 al 30% sin lactobacilo (Control 1), Ca(OH)₂ en pasta (Control 2) (para su colocación se utilizó una jeringa de insulina) agua destilada estéril (Control 3), gentamicina (Control 4) y discos de susceptibilidad ampicilina (Control 5). Después, los discos se transfirieron con ayuda de dos pinzas antiestáticas de precisión a las placas petri inoculadas con *E. faecalis*; la experimentación se realizó por triplicado para permitir un análisis estadístico adecuado.



Figura 8. Colocación de la solución en gel de *L. reuteri* en discos de papel blanco estériles.

8.4.1.7. Evaluación de la zona de inhibición bacteriana

Una vez que los discos se transportaron a las placas de agar, fueron incubadas a 37 °C y se evaluó la zona de inhibición bacteriana en periodos de 1, 2, 3, 4 y 7 días con un micrómetro digital.

8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos registrados fue realizado a través del programa IBM SPSS Statistics utilizando el método de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, y a través del Método de Tukey para comparaciones múltiples, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$)

IX. RESULTADOS

9.1. Evaluación de la zona de inhibición bacteriana

En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos de los ensayos de difusión en discos de las distintas muestras realizadas para cada grupo tras 1, 2, 3, 4 y 7 días de incubación con la bacteria *E. faecalis*.

Visualmente se puede observar que en los grupos en los que se utilizó la solución a base de *L. reuteri* (Sistemas 1-4) no existió inhibición significativa en ninguno de los tiempos de exposición, tampoco existió diferencia significativa entre los grupos evaluados de la solución en gel de *L. reuteri* independientemente de la concentración utilizada, en la Figura 10 se muestra como la actividad antimicrobiana de los cuatro sistemas se mantuvo durante los 7 días, lo cual significa que el tiempo de exposición no genera diferencias en la actividad antimicrobiana de la solución.

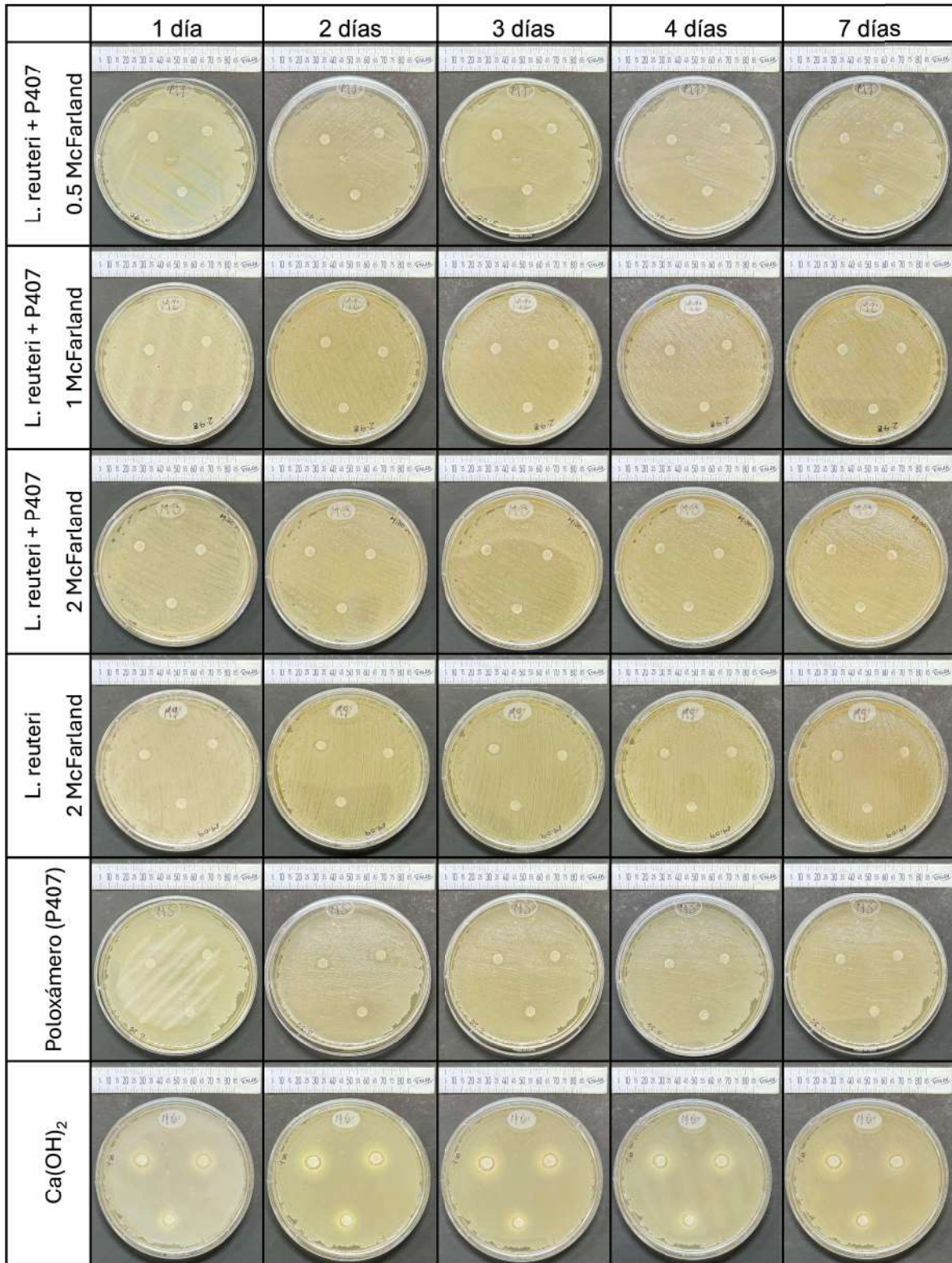
Sin embargo, en los controles positivos de Gentamicina y Ampicilina (Controles 4 y 5) se observa claramente un halo de inhibición con un promedio de 23.7 y 21.4 mm respectivamente (Tabla 1) desde que se realizó el primer control en el día 1, como se observa en la Figura 10, la gentamicina fue la que presentó mayor actividad contra el *E. faecalis* manteniendo estabilidad durante todos los días que se registraron los datos, en cambio la ampicilina a pesar de que fue efectiva, se puede observar cómo su actividad disminuyó día con día.

En el control 2 (Ca(OH)_2) se observó un halo de inhibición con promedio de 7.4 mm a partir del día 1 y como se puede observar en la Figura 10, el halo de inhibición aumentó gradualmente finalizando con un diámetro de 8.6 mm a los 7 días de incubación. Por lo que se deduce que la actividad antimicrobiana fue en ascenso, siendo mayor a los 7 días de exposición.

Asimismo, los grupos en los que se colocó agua estéril y P407 no se observó inhibición bacteriana significativa, presentando el menor de los diámetros con un promedio de 6.2 y 6.3 respectivamente tanto a en el día 1 como en el día 7.

Con base en lo establecido, estas imágenes reflejan que la solución a base de *L. reuteri* dio lugar a resultados poco satisfactorios en lo que respecta a su actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*.

IX. RESULTADOS



Continúa...

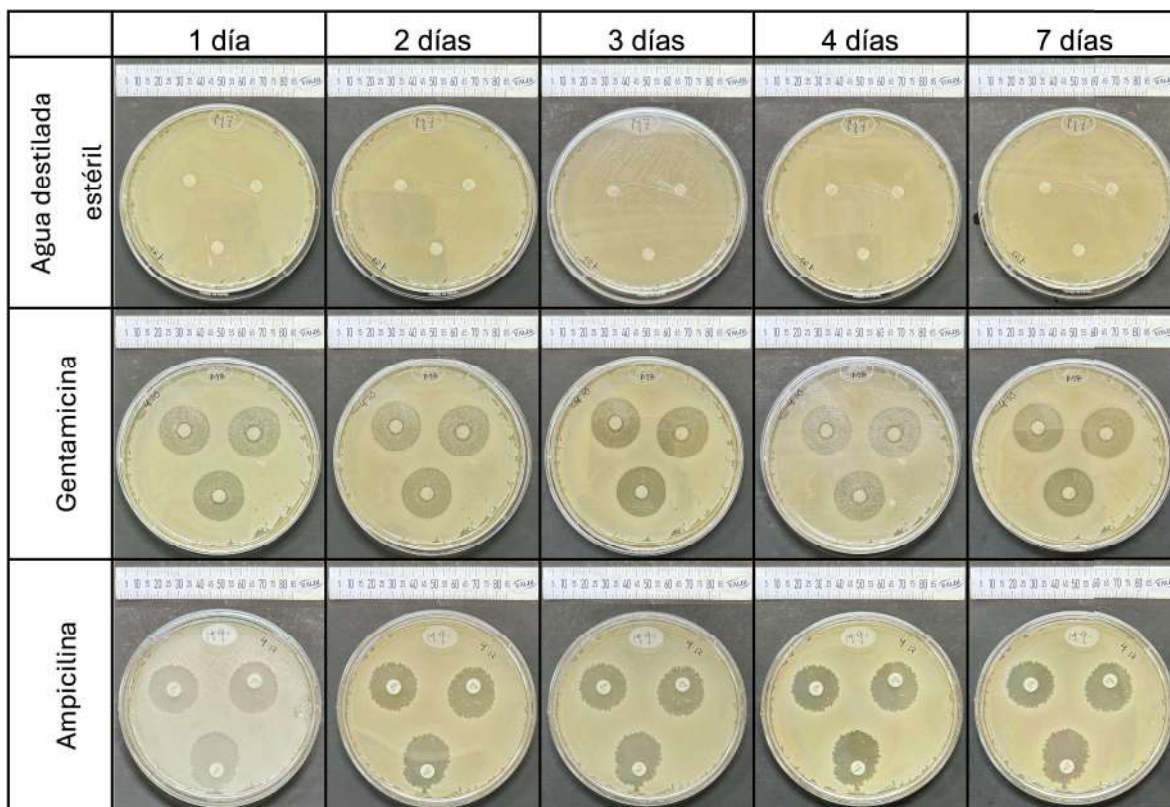


Tabla 1. Resultados de zona de inhibición bacteriana.

9.2. Análisis estadístico

En el análisis estadístico de los datos se puede observar que existió diferencia significativa en la capacidad antimicrobiana de los grupos control, con una significancia $<0.001\%$, sin embargo, no existió diferencia significativa en el tiempo de exposición de las muestras (Tabla 2).

Los grupos control que presentaron diferencia significativa $<0.001\%$ fueron el $\text{Ca}(\text{OH})_2$, la gentamicina y la ampicilina. Entre los grupos que se evaluó la capacidad de *L. reuteri*, la diferencia fue mayor a la establecida y las pruebas post hoc (Tabla 3) no mostraron diferencias entre ninguno de los grupos evaluados, de igual manera, el P407 por sí solo no mostró diferencia significativa. El grupo en el que se evaluó el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ presentó diferencias significativas $<0.001\%$ contra todos los demás grupos (Tabla 4). Finalmente, el agua destilada estéril no presentó

diferencias significativas hacia ninguno de los grupos de *L. reuteri* y P407, pero sí con los grupos de Ca(OH)_2 , ampicilina y gentamicina.

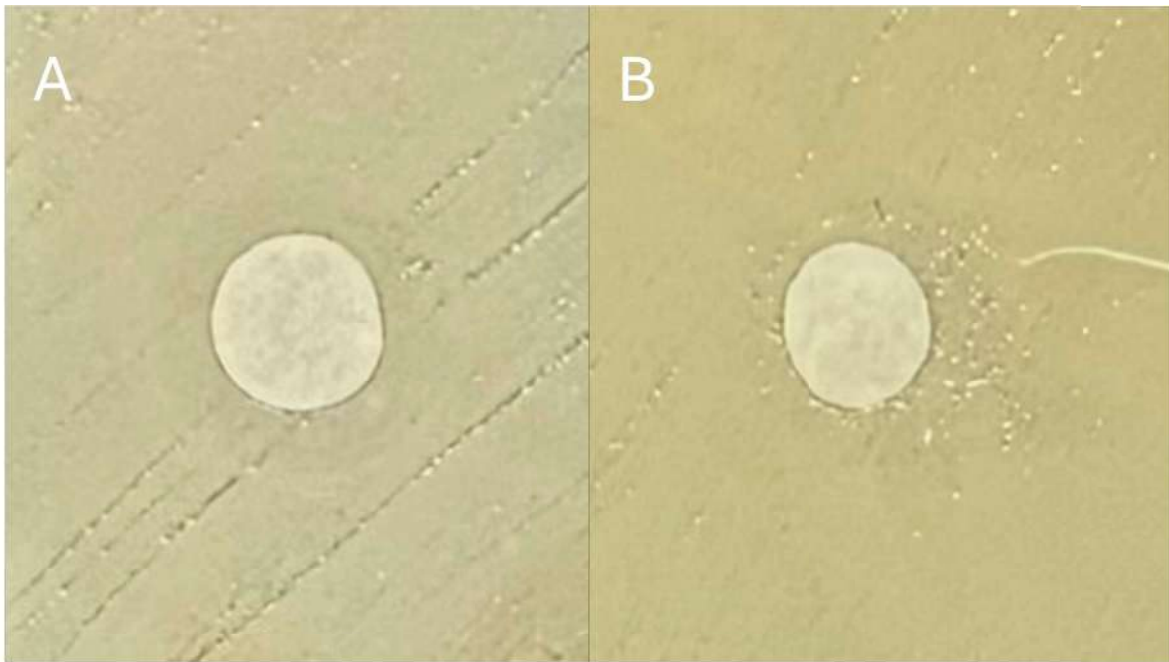


Figura 9. Discos de papel del sistema 1 y control 3 a las 24 h de incubación.

*A) Sistema 1: Disco impregnado de solución en gel de *L. reuteri* + P407 en el que se observa halo de inhibición continuo de 6.6 mm. B) Control 3: Disco de papel impregnado con agua destilada estéril en el que se observa halo de inhibición irregular de 6.17 mm.*

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
a	Entre grupos	1903.475	8	237.934	3559.760	<.001
	Dentro de grupos	2.406	36	.067		
	Total	1905.881	44			
b	Entre grupos	2032.640	8	254.080	5693.033	<.001
	Dentro de grupos	1.607	36	.045		
	Total	2034.247	44			
c	Entre grupos	1981.186	8	247.648	3574.656	<.001
	Dentro de grupos	2.494	36	.069		
	Total	1983.680	44			
Capacidad antimicrobiana	Entre grupos	1951.099	8	243.887	4740.792	<.001
	Dentro de grupos	1.852	36	.051		
	Total	1952.951	44			
Tiempo de exposición	Entre grupos	.000	8	.000	.000	1.000
	Dentro de grupos	90.000	36	2.500		
	Total	90.000	44			

Tabla 2. Análisis de varianza de una sola vía.

Comparaciones múltiples									
Variable dependiente		(I) Tipo de medicación	(J) Tipo de medicación	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
							Límite inferior	Límite superior	
a	HSD Tukey	L. reuteri 0.5 Mcf + P407	L. reuteri 1 Mcf + P407	-.05000	.16351	1.000	-.5891	.4891	
			L. reuteri 2 Mcf + P407	-.15200	.16351	.990	-.6911	.3871	
			L. reuteri 2 Mcf	.04000	.16351	1.000	-.4991	.5791	
			P407	.19800	.16351	.949	-.3411	.7371	
			Ca(OH)2	-2.05400*	.16351	<.001	-2.5931	-1.5149	
			Agua Esteril	.30600	.16351	.636	-.2331	.8451	
			Gentamicina	-16.80400*	.16351	<.001	-17.3431	-16.2649	
			Ampicilina	-14.72000*	.16351	<.001	-15.2591	-14.1809	
			L. reuteri 1 Mcf + P407	L. reuteri 0.5 Mcf + P407	.05000	.16351	1.000	-.4891	.5891
				L. reuteri 2 Mcf + P407	-.10200	.16351	.999	-.6411	.4371
				L. reuteri 2 Mcf	.09000	.16351	1.000	-.4491	.6291
				P407	.24800	.16351	.840	-.2911	.7871
		Ca(OH)2		-2.00400*	.16351	<.001	-2.5431	-1.4649	
		Agua Esteril		.35600	.16351	.441	-.1831	.8951	
		Gentamicina		-16.75400*	.16351	<.001	-17.2931	-16.2149	
		Ampicilina		-14.67000*	.16351	<.001	-15.2091	-14.1309	
		L. reuteri 2 Mcf + P407	L. reuteri 0.5 Mcf + P407	.15200	.16351	.990	-.3871	.6911	
			L. reuteri 1 Mcf + P407	.10200	.16351	.999	-.4371	.6411	
			L. reuteri 2 Mcf	.19200	.16351	.957	-.3471	.7311	
			P407	.35000	.16351	.464	-.1891	.8891	
			Ca(OH)2	-1.90200*	.16351	<.001	-2.4411	-1.3629	
			Agua Esteril	.45800	.16351	.150	-.0811	.9971	
			Gentamicina	-16.65200*	.16351	<.001	-17.1911	-16.1129	
			Ampicilina	-14.56800*	.16351	<.001	-15.1071	-14.0289	
			L. reuteri 2 Mcf	L. reuteri 0.5 Mcf + P407	-.04000	.16351	1.000	-.5791	.4991
				L. reuteri 1 Mcf + P407	-.09000	.16351	1.000	-.6291	.4491
				L. reuteri 2 Mcf + P407	-.19200	.16351	.957	-.7311	.3471
				P407	.15800	.16351	.987	-.3811	.6971
		Ca(OH)2		-2.09400*	.16351	<.001	-2.6331	-1.5549	
		Agua Esteril		.26600	.16351	.784	-.2731	.8051	
		Gentamicina		16.84400*	.16351	<.001	17.3831	16.3049	
		Ampicilina		-14.76000*	.16351	<.001	-15.2991	-14.2209	

Tabla 3. Pruebas post hoc Tukey de los sistemas 1-4.

No existieron diferencias significativas entre ninguna de las 3 concentraciones evaluadas de *L. reuteri* + P407 o de *L. reuteri* solo.

Ca(OH) ₂	L. reuteri 0.5 Mcf + P407	.82000 [*]	.13361	<.001	.3795	1.2605
	L. reuteri 1 Mcf + P407	.80800 [*]	.13361	<.001	.3675	1.2485
	L. reuteri 2 Mcf + P407	.72000 [*]	.13361	<.001	.2795	1.1605
	L. reuteri 2 Mcf	.86000 [*]	.13361	<.001	.4195	1.3005
	P407	.97800 [*]	.13361	<.001	.5375	1.4185
	Agua Esteril	1.12400 [*]	.13361	<.001	.6835	1.5645
	Gentamicina	-16.77400 [*]	.13361	<.001	-17.2145	-16.3335
	Ampicilina	-13.83800 [*]	.13361	<.001	-14.2785	-13.3975

Tabla 4. Pruebas post hoc Tukey del control 2.

Ca(OH)₂ presentó diferencias significativas hacia todos los grupos control.

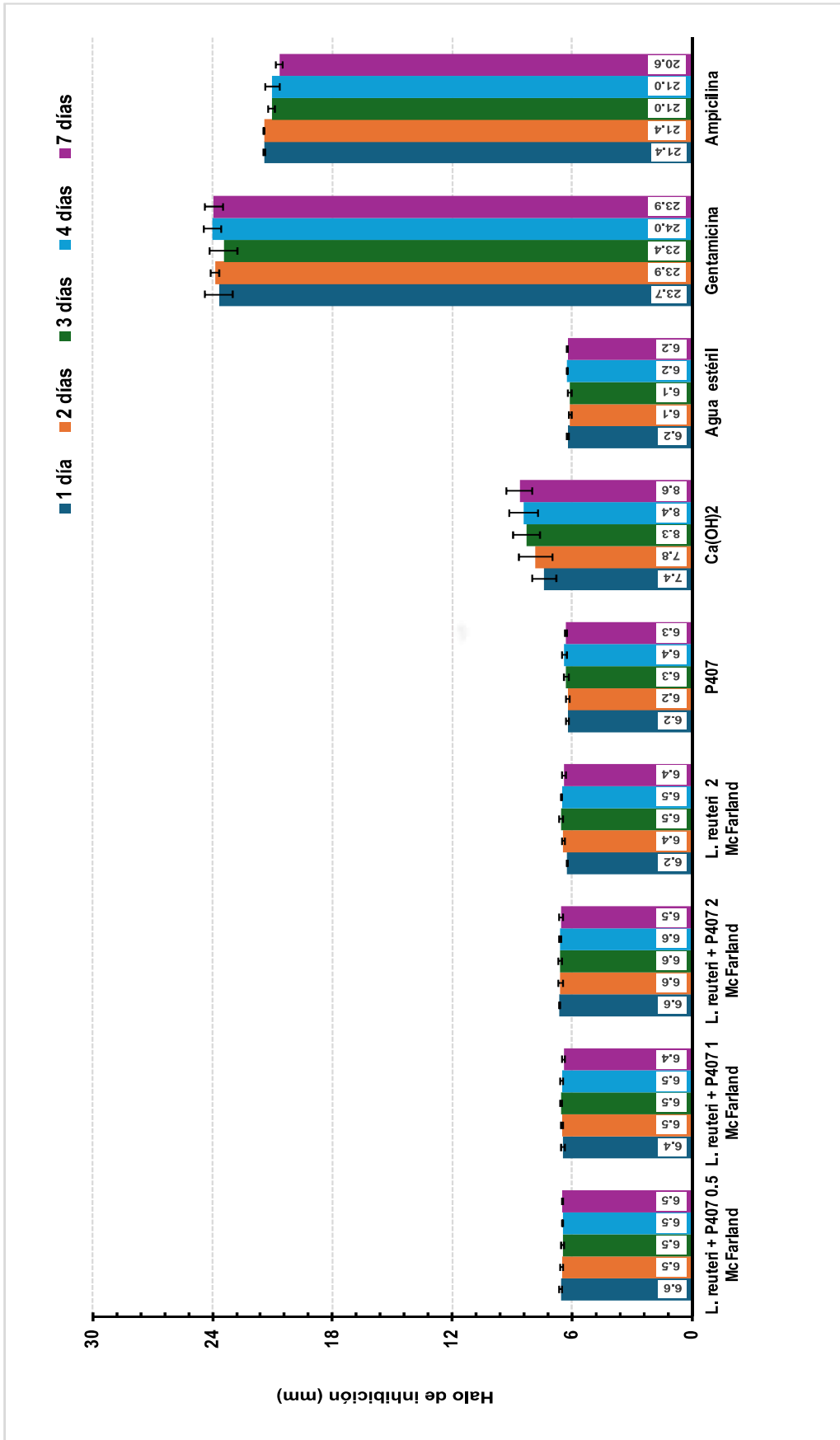


Figura 10. Promedio de halo de inhibición bacteriana de los grupos control

X. DISCUSIÓN

La medicación intraconducto se basa en el uso de agentes con propiedades antimicrobianas que son colocados en el interior del conducto radicular con la finalidad de eliminar las bacterias difíciles de erradicar mediante la irrigación convencional; se busca la utilización de una sustancia que tenga la capacidad de eliminar las bacterias residuales en las variaciones anatómicas del conducto radicular a las cuales es difícil acceder con la instrumentación. Con base en investigaciones previas de Microbiología y Probióticos en los que se define al microbioma humano como un componente microbiano normal que se necesita para conservar la salud, Bohora propone la existencia de microorganismos benéficos que estén relacionados con la salud endodóntica, la cual podría alcanzarse mediante la administración de probióticos que actúen modulando la respuesta inflamatoria, produciendo sustancias antimicrobianas como bacteriocinas y peróxidos, inhibiendo la invasión epitelial de patógenos o compitiendo con otros patógenos potenciales, a lo que denominó terapia de reemplazo microbiano. En la actualidad se conoce que debido a la complejidad anatómica radicular es imposible acceder a la totalidad del conducto con las técnicas actuales de desinfección e instrumentación, e incluso el medicamento más utilizado para medicación intraconducto ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) posee múltiples limitantes, por lo que lejos de obtener una completa esterilización del sistema de conductos, lo mejor a lo que se puede aspirar con la endodoncia convencional es a una disminución en la carga bacteriana, por lo tanto surge la necesidad de buscar alternativas novedosas que den como resultado un mayor éxito a largo plazo en el tratamiento endodóntico (26). Un par de años después, el mismo autor realizó un estudio preliminar en el que se probaba la eficacia de ciertas cepas de probióticos contra patógenos endodónticos difíciles de erradicar mediante tratamiento convencional: *E. faecalis* y *C. albicans*. Introdujo probióticos de especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium bifidum* en cultivos bacterianos de *E. faecalis* y *C. albicans* en estado planctónico mediante placas de agar y pruebas de antagonismo diferido. Además, se comprobó su

efectividad contra estas mismas bacterias en estado de biofilm colocando los probióticos directamente al interior del conducto radicular utilizando una solución de P407 como vehículo. Ambos grupos tuvieron resultados favorables cuando se evaluó la actividad antimicrobiana en las placas de agar, pero no se mostró ningún efecto en el método de antagonismo diferido. En cambio, cuando se suministraron directamente en el conducto se reveló que los probióticos crearon restricciones para el crecimiento de ambos patógenos endodónticos, por lo que el autor sugiere un cambio de paradigma en el que la búsqueda no sea la completa erradicación de los microorganismos en el sistema de conductos, si no la restauración de la microbiota normal (27), con tales fundamentos, en este estudio se decidió analizar la actividad antimicrobiana de la cepa *L. reuteri*, extraída de tabletas orales ProDentis siguiendo el protocolo establecido por Seifelnasr en 2014 y reestudiado por Widyarman *et al.* en el que utilizaron esta cepa como irrigante contra los microorganismos *E. faecalis* y *C. albicans*, mediante ensayos con colorante cristal violeta obteniendo resultados favorables, sin embargo, la metodología utilizada en esta ocasión demostró que la cepa *L. reuteri* posee poca o nula actividad antimicrobiana contra el *E. faecalis* cuando es utilizado el método de difusión en discos.

Widyarman *et al.* evaluaron los efectos de la reuterina pura, la cual es un componente producido por la especie *L. reuteri* que posee un amplio espectro antimicrobiano; optaron por utilizarla como solución irrigante realizando estudios *in vitro* y *ex vivo* de biofilm de *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *C. albicans* demostrando resultados alentadores cuando se comparaba con los resultados obtenidos con el NaOCl, *en cambio*, la metodología experimental que se utilizó en este estudio busco la utilización de la cepa tal cual extraída y no solo sus derivados para comprobar su eficacia, similar a lo que realizó Bohora con otras cepas de probióticos (27), además este estudio buscaba analizar si la concentración de la bacteria influye de manera positiva en su actividad antimicrobiana, no obstante, los resultados obtenidos demostraron que independientemente de la concentración de *L. reuteri* utilizada, el halo de inhibición no es significativo cuando es comparado con Ca(OH)_2 , gentamicina o ampicilina. Algo interesante a destacar es que a pesar de que la zona de inhibición no resultó ser de gran tamaño, la pequeña área que se

logró inhibir alrededor de los discos se observa continua (Figura 9 A) en comparación al control negativo de agua estéril (Figura 9 B), por lo que podría existir algún efecto antimicrobiano, sin embargo la cantidad de solución en gel colocada no fue la suficiente para alcanzar un halo de inhibición notorio a simple vista.

Shaaban en 2022 (42) realiza un estudio in vitro en placas de agar en el que realiza pocillos de 6 mm de diámetro y adiciona 200 μ L de un cóctel de tres microorganismos en proporciones iguales: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, y *Lactobacillus acidophilus*, de igual manera evaluó cada cepa por separado en estado líquido y en gel agregando P407 a la mezcla. Todos los grupos control obtuvieron resultados favorables, destacando al grupo en el que se realizó la combinación de los tres tipos de probióticos, por lo que se puede inferir que el hecho de agregar varios tipos de lactobacilos aumenta la capacidad antimicrobiana por lo que para futuros estudios con *L. reuteri*, se podría intentar adicionar alguno de los mencionados con anterioridad para aumentar la efectividad contra *E. faecalis*.

XI. CONCLUSIONES

Con base en lo discutido se puede concluir que las concentraciones evaluadas de la solución de *L. reuteri* tanto en combinación con el P407, como el lactobacilo por sí solo poseen poco o nulo efecto antimicrobiano ya que no exhibieron actividad inhibitoria contra *E. faecalis* en comparación al Ca(OH)_2 cuando son utilizados como medicación intraconducto, por lo que se confirma la hipótesis alternativa (H1). Sin embargo, el hecho de que el halo de inhibición que se observó en las placas fue uniforme podría significar un potencial en su utilización, por lo que se sugiere continuar con estudios que exploren a profundidad el uso de *L. reuteri* como bacterioterapia en endodoncia.

XII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar la experimentación de difusión en agar en pocillos de manera que permita colocar mayor cantidad de solución en las placas de agar.
2. Se recomienda adicionar algún otro tipo de probiótico para analizar si aumenta la capacidad antimicrobiana.
3. Se recomienda evaluar la actividad antimicrobiana contra algún otro patógeno endodóntico.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. American Association of Endodontists. Guide to Clinical Endodontics. 6th ed. 2019.
2. Soares J. Goldberg F. Endodoncia, técnica y fundamentos. . Editorial Médica Panamericana; 2002.
3. MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. Caries Res. 2020 Jan 1;54(1):7–14. <https://doi.org/10.1159/000503309> PMID: 31590168
4. Hargreaves Kenneth M BLHCS. Seltzer and Bender's dental pulp. 2nd ed. Quintessence Publishing; 2012.
5. Sun C, Xie Y, Hu X, Fu J, Zhou J, Wu L. Relationship between Clinical Symptoms and the Microbiota in Advanced Caries. J Endod. 2020 Jun 1;46(6):763–70. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.02.011> PMID: 32295705
6. 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.). <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.tb00522.x> PMID: 17546859
7. Hargreaves KM BLCS. Vias de La Pulpa. Decima edición. España: ELSEVIER; 2011.
8. Sundqvist G, Sweden U. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol [Internet] . 1994;78(4):522–30. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220\(94\)90047-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220(94)90047-7)
9. Hargreaves Kenneth M BLHCS. Vias de La Pulpa. 11th ed. España: Elsevier Castellano; 2011.
10. Stojcic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. J Endod. 2013 Apr;39(4):473–7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.024> PMID: 23522539

11. Cynthia Rodríguez-Niklitschek GHO V. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review. *Revista Odontológica Mexicana* [Internet]. 2015;19(3):177–82.
12. Zehnder M. Root Canal Irrigants. Vol. 32, *Journal of Endodontics*. 2006. p. 389–98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.09.014> PMID: 16631834
13. Attavar SH, Hegde MN. Effect of Irrigants and Irrigating Devices on Disinfection of Root Canal System: A Systematic Review. Vol. 12, *Journal of Advanced Oral Research*. Sage Publications India Pvt. Ltd; 2021. p. 181–6. <https://doi.org/10.1177/23202068211015878>
14. Ahmad MZ, Sadaf D, Merdad KA, Almohaimeed A, Onakpoya IJ. Calcium hydroxide as an intracanal medication for postoperative pain during primary root canal therapy: A systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis of randomised controlled trials. Vol. 22, *Journal of Evidence-Based Dental Practice*. Elsevier Inc.; 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2021.101680> PMID: 35219466
15. Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2012 Apr;45(4):311–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01976.x> PMID: 22077915
16. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *International Endodontic journal*. 1992;2(5):97–106.
17. Fava LRG, Saunders W.P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications | Enhanced Reader. *Int Endod J*. 1999;32:257–82.
18. Ordinola- Zapata R, Noblett W. C, Perez- Ron A, Zhou Y, Vera J. Present status and future directions of intracanal medicaments | Enhanced Reader. *Int Endod J*. 2022;55(3):613–36. <https://doi.org/DOI: 10.1111/iej.13731>
19. Zancan RF, Calefi PHS, Borges MMB, Lopes MRM, de Andrade FB, Vivan RR, et al. Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. *Microsc Res Tech*. 2019 May 1;82(5):494–500. <https://doi.org/10.1002/jemt.23192> PMID: 30597714

20. Orucoglu H, Cobankara FK. Effect of Unintentionally Extruded Calcium Hydroxide Paste Including Barium Sulfate as a Radiopaque Agent in Treatment of Teeth with Periapical Lesions: Report of a Case. *J Endod.* 2008 Jul;34(7):888–91. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.04.012> PMID: 18571001
21. Singh Grover H, Luthra S. Probiotics-the nano soldiers of oral health. *JACM.* 2011;13(1):48–54.
22. Meurman J-H. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci.* 2005;113:188–96.
23. Pujia AM, Costacurta M, Fortunato L. The probiotics in dentistry: a narrative review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21:1405–12.
24. Bohora A, Kokate S. Evaluation of the role of probiotics in endodontic treatment: A preliminary study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2017 Jan 1;7(1):46–51. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.200710>
25. Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Do Prado AS, de Oliveira DP, et al. Dietary supplementation with multi-strain formula of probiotics modulates inflammatory and immunological markers in apical periodontitis. *Journal of Applied Oral Science.* 2021;29:1–8. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2020-0483> PMID: 33503222
26. Bohora AA, Sharad D, Kokate R. CONCEPT OF PROBIOTICS IN ENDODONTICS. *Int J Adv Res (Indore) [Internet].* 2016;4(7):1137–42. <https://doi.org/10.21474/IJAR01>
27. Bohora A, Kokate S, Khedkar S, Vankudre A. Antimicrobial activity of probiotics against endodontic pathogens:- A preliminary study. *Indian J Med Microbiol.* 2019 Jan 1;37(1):5–11. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_333 PMID: 31424003
28. Poornima P, Shashikala K, Keshava Prasad BS, R AU. Probiotics-The Future of Bacteriotherapy in Endodontics: A Review. *IOSR-JDMS [Internet].* 2020;19(12):01–6. <https://doi.org/10.9790/0853-1912110106>
29. Kim AR, Ahn KB, Yun CH, Park OJ, Perinpanayagam H, Yoo YJ, et al. *Lactobacillus plantarum* Lipoteichoic Acid Inhibits Oral Multispecies Biofilm. *J*

- Endod. 2019 Mar 1;45(3):310–5. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.12.007>
 PMID: 30803538
30. Ellie J C Goldstein KLTDMC. Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis.* 2012 May 15;60(2):S98–107. <https://doi.org/DOI: 10.1093/cid/civ072> PMID: PMID: 25922408
 31. Luo M, Hu MM, Feng X, XiaoLi W, Dong DG, Wang WC. Preventive effect of Lactobacillus reuteri on melanoma. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2020 Jun 1;126. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109929> PMID: 32126498
 32. Ochôa C, Castro F, Bulhosa JF, Manso C, Fernandes JCH, Fernandes GVO. Influence of the Probiotic L. reuteri on Periodontal Clinical Parameters after Nonsurgical Treatment: A Systematic Review. *Microorganisms.* 2023 May 30;11(6):1449. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061449>
 33. Bravo J, Morales A, Lefimil C, Galaz C, Gamonal J. Efectos clínicos de Lactobacillus reuteri en el tratamiento de la gingivitis: Ensayo clínico aleatorizado controlado. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral.* 2018 Apr;11(1):32–5. <https://doi.org/10.4067/s0719-01072018000100032>
 34. Mohammed AA, Hussain NA, Niamah AK. Antibacterial spectrum of produced reuterin from new isolates of Lactobacillus reuteri. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.* 2020;10(1):134–9. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.10.1.134-139>
 35. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 75049, 3-Hydroxypropanal. . 2023.
 36. Widyarman AS, Lazaroni NE. Persistent Endodontics Pathogens Biofilm Inhibited by Lactobacillus reuteri Indonesian Strain Lactobacillus reuteri Indonesian. *Journal of Dentistry Indonesia [Internet].* 2019 Dec 31;26(3). <https://doi.org/10.14693/jdi.v26i3.1113>
 37. Widyarman AS, Halim LA, Jesslyn, Irma HA, Richi M, Rizal MI. The potential of reuterin derived from Indonesian strain of Lactobacillus reuteri against endodontic pathogen biofilms in vitro and ex vivo. *Saudi Dental Journal.* 2023 Feb 1;35(2):154–64. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2023.01.002>

38. Brambilla E, Locarno S, Gallo S, Orsini F, Pini C, Farronato M, et al. Poloxamer-Based Hydrogel as Drug Delivery System: How Polymeric Excipients Influence the Chemical-Physical Properties. *Polymers (Basel)*. 2022 Sep 1;14(17). <https://doi.org/10.3390/polym14173624>
39. Patel HR, Patel RP, Patel MM. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. Vol. 1, *International Journal of PharmTech Research CODEN*.
40. Seifelnasr K. A preliminary study evaluating potential probiotic use in A preliminary study evaluating potential probiotic use in endodontics [Internet] [Graduate Theses, Dissertations, and Problem Reports]. West Virginia University ; 2014.
41. Gayathiri E. Study of the enumeration of twelve clinical important bacterial populations at 0.5 McFarland standard [Internet]. Vol. 6, *International Journal of Creative Research Thoughts (IJCRT) |*. 2018.