

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
POSTGRADO DE ENDODONCIA

**ASPECTOS RELEVANTES DE *ENTEROCOCCUS*  
*FAECALIS* Y SU PARTICIPACIÓN EN LAS INFECCIONES DE  
ORIGEN ENDODÓNTICO**

Trabajo especial de grado presentado  
ante la ilustre Universidad Central de  
Venezuela por la Odontólogo Alejandra  
Carolina Díaz Peña para optar al título de  
Especialista en Endodoncia

Caracas, Noviembre de 2007

## LISTA DE CONTENIDOS

	Página
VEREDICTO APROBATORIO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE CONTENIDOS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	x
RESUMEN.....	xvii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ENTEROCOCOS.....	3
1.1 Características microbiológicas de <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> .....	6
1.2 Métodos de detección de <i>Enterococcus faecalis</i> ..	17
1.2.1 Cultivo y Observación Microscópica.....	18
1.2.2 Métodos moleculares.....	21

1.2.2.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	23
1.2.2.2	Transcriptasa Reversa PCR.....	29
1.3	Factores de virulencia de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	32
1.3.1	Sustancia de agregación.....	33
1.3.2	Adhesinas o proteínas de superficie.....	35
1.3.3	Feromonas sexuales.....	39
1.3.4	Ácido lipoteicoico.....	40
1.3.5	Superóxido extracelular.....	42
1.3.6	Gelatinasa.....	43
1.3.7	Hialuronidasa.....	43
1.3.8	Citolisina (Hemolisina).....	44
2.	MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO.....	47
3.	INCIDENCIA DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> EN LAS INFECCIONES ENDODÓNTICAS.....	51
3.1	Dientes con infección primaria.....	53
3.2	Dientes con periodontitis apical persistente..	58
4.	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> .....	70
4.1	Control microbiológico con medicación local.....	71
4.1.1	Irrigantes.....	71

4.1.1.1	Hipoclorito de sodio.....	72
4.1.1.2	Digluconato de clorhexidina.....	76
4.1.1.3	MTAD® .....	78
4.1.2	Medicación intraconducto.....	81
4.1.2.1	Hidróxido de calcio.....	82
4.1.2.2	Digluconato de clorhexidina.....	87
4.1.2.3	Paramonoclorofenol alcanforado.....	91
4.1.3	Durante la obturación.....	93
4.1.3.1	Puntas de gutapercha.....	93
4.1.3.2	Cementos selladores.....	94
4.1.4	Métodos experimentales.....	96
4.2	Control microbiológico con medicación sistémica utilizada como medicación intraconducto.....	99
III.	DISCUSIÓN.....	103
IV.	CONCLUSIONES.....	108
V.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

## LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1. Microfotografía electrónica de barrido de: a) Biopelículas formadas en la pared del conducto radicular bajo condiciones aeróbicas ricas en nutrientes (2500X); b) Penetración bacteriana dentro de los túbulos dentinarios bajo condiciones aeróbicas ricas en nutrientes (1500X); c) Biopelícula formada en la pared del conducto radicular bajo condiciones anaeróbicas ricas en nutrientes (2500X); d) Penetración bacteriana dentro de los túbulos dentinarios bajo condiciones anaeróbicas ricas en nutrientes (1500X); e) Estructura granular formada por un grupo bacteriano en la superficie radicular bajo condiciones anaeróbicas rico en nutrientes (200X); f) Vista magnificada de la superficie granular (3000X)..... 11

Gráfico 2. a) Biopelícula de *E. faecalis* en un filtro membrana de nitrato celuloso luego de 48 horas de incubación (10000X); b) Biopelícula de *E. faecalis* luego de 30 minutos en contacto con Tetraclean<sup>®</sup> (5000X); c) Biopelícula disociada luego de 30 minutos en contacto con Biopure MTAD<sup>®</sup> (5000X); d) Biopelícula completamente removida luego de 30 minutos en contacto con Hipoclorito de sodio al 5.25% (5000X)..... 13

Gráfico 3. Dibujo esquemático del gen de ARNr 16S (ADNr). Las áreas amarillas corresponden a las regiones variables, las cuales contienen información acerca del género y la especie. Las áreas rojas corresponden a las regiones conservadas del gen..... 23

Gráfico 4. Esquema del PCR. .... 25

Gráfico 5. Factores de virulencia de <i>Enterococcus faecalis</i> . .....	32
Gráfico 6. Similitud estructural entre las proteínas de superficie <i>Bap</i> y <i>Esp</i> . Se muestra el porcentaje de igualdad entre distintas regiones de estas proteínas.....	37
Gráfico 7. Cuadro resumen de los factores de virulencia de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	45
Gráfico 8. Especies más prevalentes asociadas a lesiones perirradiculares asintomáticas de dientes no tratados.....	55
Gráfico 9. Especies más prevalentes en dientes con periodontitis apical aguda .....	55
Gráfico 10. Prevalencia de <i>E. faecalis</i> en infecciones endodónticas asociadas con diferentes formas de enfermedades perirradiculares. AAP: periodontitis apical aguda. APA: absceso perirradicular agudo. CPL: lesión perirradicular crónica. ....	58
Gráfico 11. Estadíos importantes para el microorganismo involucrado en una infección persistente. ....	61
Gráfico 12. Especies más prevalentes en dientes con tratamiento de conductos y lesiones perirradiculares crónicas. ....	66
Gráfico 13. Detección de <i>E. faecalis</i> usando las técnicas de cultivo y PCR .....	68

## RESUMEN

Las bacterias y sus productos participan de manera importante en el desarrollo de las lesiones perirradiculares. Saber cómo estos microorganismos son capaces de sobrevivir dentro del sistema de conductos radiculares es una premisa fundamental para lograr la completa erradicación de los mismos y así el éxito de la terapia endodóntica. *Enterococcus faecalis* ha sido el microorganismo mayormente aislado de las lesiones perirradiculares persistentes. Gracias a la presencia de factores de virulencia como la sustancia de agregación y las proteínas de superficie entre otros, así como también por la capacidad de formación de biopelículas, éste microorganismo puede penetrar profundamente en el interior de los túbulos dentinarios, adherirse al colágeno de las paredes de dentina radicular y así sobrevivir a los protocolos de irrigación y de medicación intraconducto utilizados en la terapia endodóntica. Actualmente se está empleando el uso de irradiación con laser para la desinfección del sistema de conductos radiculares.

## I. INTRODUCCIÓN

La literatura endodóntica ha establecido claramente la participación de los microorganismos y sus productos en el desarrollo de la periodontitis apical. La periodontitis apical persistente se origina cuando la terapia endodóntica *per se* no elimina adecuadamente la infección intrarradicular.

Actualmente, la ciencia de la microbiología bucal está atravesando un período de cambios, donde se deja atrás la era de cultivos bacterianos para adentrarse en la nueva era de métodos y técnicas genéticas moleculares, mediante las cuales se han podido detectar e identificar numerosas especies de microorganismos que no son cultivables y que tienen una parte fundamental en el desarrollo de las infecciones endodónticas, bien sea primarias o persistentes.

Tal es el caso de *Enterococcus faecalis*, microorganismo preponderante en las infecciones endodónticas persistentes, el cual gracias a sus características fenotípicas y microbiológicas particulares es capaz de

sobrevivir en medios ambientes áridos con poca cantidad de oxígeno y nutrientes, así como también es capaz de formar biopelículas entre microorganismos de su misma especie o con otros microorganismos y de sobrevivir frente a protocolos de irrigación, medicaciones intraconducto y materiales de obturación.

Por todas estas características presentes en *Enterococcus faecalis* y por la necesidad de cumplir con el objetivo biológico principal de la terapia endodóntica, es decir, la eliminación de la infección o la prevención de la misma, es importante conocer la acción de cada medicamento intraconducto, irrigante o material de obturación sobre este microorganismo.

El objetivo de este trabajo especial de grado es analizar los aspectos relevantes de *Enterococcus faecalis*, sus características microbiológicas, sus factores de virulencia y su capacidad de formación de biopelículas, así como también su participación en las infecciones de origen endodóntico y su control durante la terapia endodóntica.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ENTEROCOCOS

Los enterococos son microorganismos que forman parte de la flora normal en la cavidad bucal y el tracto gastrointestinal y han sido reconocidos como potenciales patógenos humanos causando el 12% de las infecciones nosocomiales, entre éstas se incluyen las infecciones del tracto urinario, infecciones intra-abdominales y endocarditis infecciosa.<sup>(1,2)</sup> Su naturaleza le permite crecer y sobrevivir en medios ambientes áridos; de esta manera lo podemos encontrar en el suelo, la comida, el agua, las plantas y los animales como pájaros e insectos.<sup>(3)</sup>

Hasta mediados de 1980, los enterococos no eran considerados como un género bacteriano separado, a pesar de sus características particulares que lo diferenciaban de los estreptococos. Características como su teñido, forma y disposición celular, así como la ausencia de catalasa, lo ubicaban dentro del Género *Streptococcus*. Con la clasificación serológica de Lancefield y el descubrimiento del antígeno del grupo D, los enterococos fueron clasificados como estreptococos del grupo D tolerante a la sal. Sin embargo, el antígeno del grupo D es un ácido lipoteicoico, uno de los componentes que se encuentra en casi todas las bacterias Gram positivas, y difiere

del antígeno de los carbohidratos de la pared celular de los otros estreptococos.<sup>(1)</sup>

Fue en 1984 cuando los enterococos obtuvieron un género formal luego de estudios de hibridización ADN-ADN o ADN-ARN demostrando mayores diferencias en comparación con los estreptococos; en ese momento se introdujeron dos nuevos Géneros: *Enterococcus* y *Lactococcus*.<sup>(1)</sup>

Para que los enterococos puedan actuar como patógenos primero deben adherirse a los tejidos del hospedero; éstos pueden hacerlo a través de ligandos adhesivos específicos a la matriz extracelular de los mismos. Durante el proceso de invasión a los tejidos, los enterococos deben encontrarse en un medio ambiente con potenciales de óxido reducción elevados, nutrientes esenciales limitados, leucocitos fagocíticos y otras defensas del hospedero. Todos estos factores ayudan a que se expresen genes que favorecen el crecimiento del microorganismo.<sup>(4)</sup>

Los enterococos poseen habilidades únicas y potenciales de intercambiar material genético entre ellos mismos y con otros microorganismos. Existen al menos tres sistemas de conjugación

a través de los cuales los enterococos pueden transferir naturalmente elementos genéticos. El primero, la presencia de plásmidos que poseen información genética para la receptividad de las feromonas únicamente descritos para los enterococos. Segundo, una variedad de plásmidos que fácilmente son transferidos a baja frecuencia entre enterococos, especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Lactobacillus* entre otras; y tercero, el intercambio genético conjugativo que ocurre entre factores que se encuentran en la membrana de numerosas bacterias Gram negativas y Gram positivas. <sup>(4)</sup>

Existen 23 especies pertenecientes al Genero *Enterococcus* y éstas a su vez se dividen en 5 grupos basados en su interacción con el manitol, el sorbitol y la arginina. *Enterococcus faecalis* pertenece al mismo grupo del *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii* y *Enterococcus gallinarum*. *E. faecalis* responde negativamente a la arabinosa y excepto por algunas variantes atípicas, es el único miembro del grupo que utiliza el piruvato y tolera el telurito. <sup>(5)</sup>

Por su parte, *E. faecalis* ha sido el microorganismo patógeno más asociado a las infecciones endodónticas persistentes, siendo aislado frecuentemente de la flora microbiana mixta

o de monocultivos. Probablemente este microorganismo es el que mejor se adapta y tolera las condiciones ecológicas existentes en los conductos radiculares obturados, gracias a ciertas características microbiológicas como sus factores de virulencia y su capacidad de formar biopelículas. Por ello, es importante profundizar en dichas características microbiológicas y entender cuál es el papel que desempeña cada una de ellas en el desarrollo, crecimiento y supervivencia del mismo dentro del sistema de conductos radiculares (SCR).

### **1.1 Características microbiológicas de *Enterococcus faecalis***

*E. faecalis* es un coco Gram positivo que puede aparecer solo, en pares o en cadenas; éstas células pueden aparecer como coco-bacilos cuando se realiza la tinción de Gram en muestras provenientes de placas de Agar o pueden aparecer ovoides o en cadenas cuando se realiza la tinción de Gram en muestras provenientes de caldo de tioglicolato. Éste es un microorganismo anaerobio facultativo y su crecimiento óptimo ocurre a 35°C; sin embargo, también se ha observado crecimiento entre 10 y 45°C. Todas las cepas pueden crecer en caldos que contengan cloruro de sodio al 6,5% y esculina hidrolizada en presencia de sales biliares al 40% (medio de

bilis-esculina). Casi todas las cepas de este microorganismo son homofermentativas, no producen gas, no contienen enzimas citocrómicas y el ácido láctico resulta el producto final de la fermentación de la glucosa. <sup>(1,3)</sup>

Por su parte, *E. faecalis* posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cual es un ácido lipoteicoico glicerol intracelular asociado con la membrana citoplasmática. La pared celular está constituida por una gran cantidad de peptidoglicanos y ácido teicoico. <sup>(1)</sup>

Una característica importante de *E. faecalis* es su habilidad de crecer en medios con pH ácido y alcalino, donde este último normalmente inhibe el crecimiento y supervivencia de muchos otros microorganismos. Con relación a esto, McHugh *et al* <sup>(6)</sup> evaluaron el pH necesario para inhibir su crecimiento y el experimento *in vitro* demostró que se necesita un pH mayor de 11,0 para la erradicación de este microorganismo.

Estos autores refieren que el hidróxido de calcio como medicación intraconducto puede alcanzar un pH crítico dentro del SCR. Sin embargo, la ubicación de este microorganismo dentro de los túbulos dentinarios es incierta. Aparentemente,

el pH crítico mayor de 11,0, también conocido como umbral de erradicación no se logra en la dentina luego de la aplicación del hidróxido de calcio. Esto hace suponer que *E. faecalis* puede persistir en los túbulos dentinarios y quizás volver a infectar el conducto radicular. <sup>(6)</sup>

Nakajo *et al* <sup>(7)</sup>, en este mismo sentido, evaluaron las propiedades bioquímicas de *E. faecalis* que le confieren la resistencia ácido-alcalina, comparándola con la de *Streptococcus mutans*. *E. faecalis* mostró una ácido-resistencia similar a *S. mutans* y una mayor alcalino-resistencia. Estos autores sugieren que la resistencia al pH de *E. faecalis* se puede atribuir a la resistencia de la membrana citoplasmática frente a medios ácidos o alcalinos junto con el sistema de transporte de protones vinculado al ATP.

Junto con la propiedad de sobrevivir a medios ambientes con pH ácidos o alcalinos, *E. faecalis* ha demostrado también ser capaz de formar comunidades microbianas adheridas a superficies o “biopelículas”.

Las biopelículas pueden ser definidas como comunidades de microorganismos adheridas a una superficie y embebidas en

una matriz de polisacáridos y proteínas formando una capa viscosa. La matriz representa generalmente el 85% del volumen de la biopelícula. <sup>(1)</sup>

En relación a esto, se han realizado numerosas investigaciones donde se afirma la capacidad de *E. faecalis* de formar biopelículas y así poder sobrevivir a ciertas medicaciones intraconducto y a diversos protocolos de irrigación. Uno de ellos es el trabajo realizado por George *et al* <sup>(8)</sup>, quienes evaluaron la influencia de distintas condiciones ambientales y nutricionales en las características de las biopelículas formadas por *E. faecalis* en el SCR y su penetración dentro de los túbulos dentinarios. Las condiciones ambientales estudiadas fueron medios ambientes aerobios y anaerobios ricos y pobres en nutrientes.

Bajo el microscopio electrónico de barrido se pudo evidenciar la formación de distintos tipos de biopelículas dependiendo del tipo de medio ambiente y nutrición. Cuando *E. faecalis* creció en un medio ambiente aeróbico y rico en nutrientes, se pudo observar formación de biopelículas y penetración profunda de los microorganismos dentro de los túbulos dentinarios. Cuando creció bajo condiciones anaeróbicas y ricas en nutrientes, se pudo observar la formación de una biopelícula con forma

característica de “hongo”, con canales de fluidos a su alrededor.

<sup>(8)</sup> (Gráfico 1)

Por el contrario, cuando las condiciones fueron aeróbicas pero con bajo nivel de nutrientes, no hubo formación de biopelícula en forma de hongos, sino que se pudieron evidenciar crecimientos discontinuos de grupos celulares adheridos. En este grupo experimental no se observó ninguna bacteria dentro de los túbulos dentinarios, lo que resultaba en una morfología dentinaria superficial irregular. En el grupo donde las condiciones eran anaeróbicas, sí se pudo observar la formación de biopelículas con células bacterianas adheridas a la superficie de la pared dentinaria del conducto radicular. <sup>(8)</sup>

En general, los investigadores señalan que la población bacteriana observada fue mayor cuando las condiciones ambientales eran ricas en nutrientes, que cuando eran escasos, por lo que se puede afirmar que el desarrollo y modificación de las biopelículas formadas por *E. faecalis* en el conducto radicular y su penetración dentro de los túbulos dentinarios se ve modulada por las condiciones ambientales prevalentes. <sup>(8)</sup>

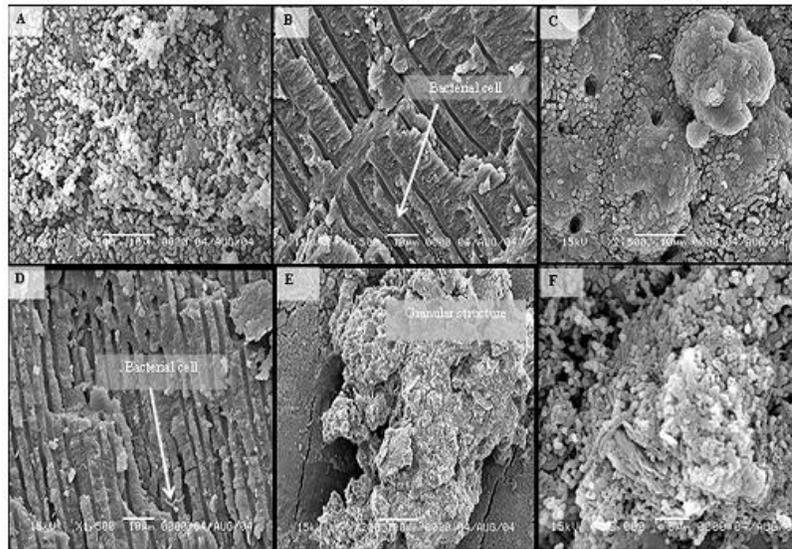


Gráfico 1. Microfotografía electrónica de barrido de: a) Biopelículas formadas en la pared del conducto radicular bajo condiciones aeróbicas ricas en nutrientes (2500X); b) Penetración bacteriana dentro de los túbulos dentinarios bajo condiciones aeróbicas ricas en nutrientes (1500X); c) Biopelícula formada en la pared del conducto radicular bajo condiciones anaeróbicas ricas en nutrientes (2500X); d) Penetración bacteriana dentro de los túbulos dentinarios bajo condiciones anaeróbicas ricas en nutrientes (1500X); e) Estructura granular formada por un grupo bacteriano en la superficie radicular bajo condiciones anaeróbicas rico en nutrientes (200X); f) Vista magnificada de la superficie granular (3000X). Tomado de George *et al.* 2005

Contrario a los resultados de la investigación descrita anteriormente, Duggan y Sedgley <sup>(9)</sup> evaluaron cuantitativamente la formación de biopelículas por parte de cepas aisladas de *E. faecalis*, provenientes de conductos radiculares y de la cavidad oral. Sus resultados señalan que no existe diferencia significativa entre la habilidad de *E. faecalis* de formar biopelículas y la fuente de aislamiento, así como también

podieron concluir que las cepas aisladas del microorganismo provenientes de la cavidad oral y conductos radiculares poseen una baja capacidad inherente de formar biopelículas, comparadas con cepas aisladas del mismo en enfermedades como la endocarditis infecciosa.

Al conocerse la capacidad de *E. faecalis* de formar biopelículas dentro del SCR, muchos investigadores se vieron en la necesidad de evaluar el efecto antimicrobiano de ciertas soluciones irrigantes, quelantes, medicaciones intraconducto e incluso antibióticos sobre estas biopelículas. Así lo demuestran Giardino *et al* <sup>(10)</sup> quienes compararon el efecto antimicrobiano del hipoclorito de sodio al 5,25%, Biopure MTAD<sup>®</sup> y Tetraclean<sup>®</sup> sobre biopelículas formadas por *E. faecalis* generadas en filtros de membranas de nitrato celuloso. Los tiempos de evaluación fueron a los 5, 30 y 60 minutos.

Los resultados señalan que el hipoclorito de sodio al 5,25% fue el único irrigante probado capaz de remover la biopelícula luego de 5 minutos de exposición, mientras que el Tetraclean<sup>®</sup> lo hizo a los 60 minutos. El MTAD Biopure<sup>®</sup> no pudo remover la biopelícula en ninguno de los tiempos evaluados.<sup>(10)</sup> (Gráfico 2)

Estos autores afirman que el Tetraclean<sup>®</sup> mostró mejor acción antibacteriana comparado con el Biopure MTAD<sup>®</sup>, pero el objetivo de la remoción total de la biopelícula se consiguió sólo luego de 30 o 60 minutos de irrigación, lo cual es considerado un tiempo prolongado durante la terapia endodóntica.<sup>(10)</sup>

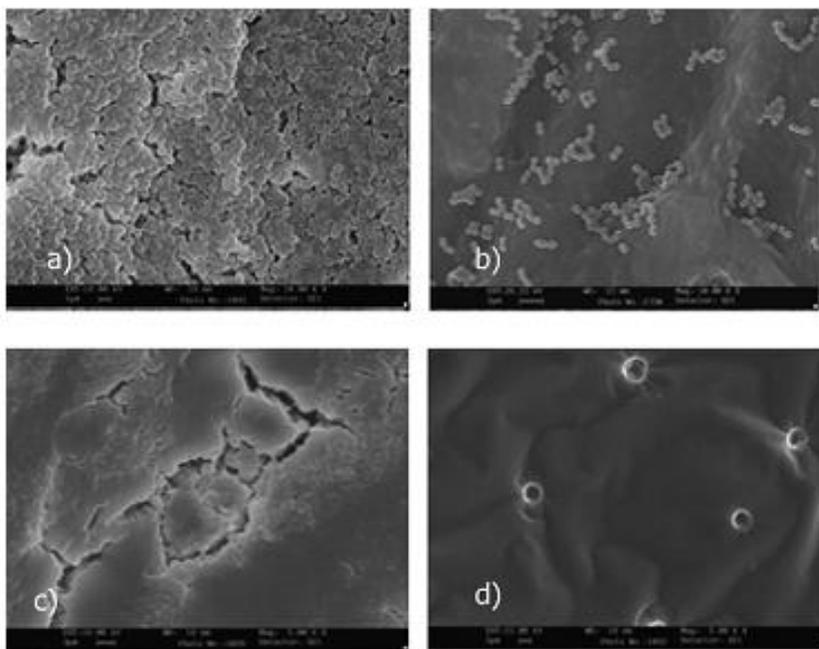


Gráfico 2. a) Biopelícula de *E. faecalis* en un filtro membrana de nitrato celuloso luego de 48 horas de incubación (10000X); b) Biopelícula de *E. faecalis* luego de 30 minutos en contacto con Tetraclean<sup>®</sup> (5000X); c) Biopelícula disociada luego de 30 minutos en contacto con Biopure MTAD<sup>®</sup> (5000X); d) Biopelícula completamente removida luego de 30 minutos en contacto con Hipoclorito de sodio al 5,25% (5000X). Tomado de Giardino et al. 2007

Por su parte, Dunavant *et al*<sup>(11)</sup> compararon la eficacia del hipoclorito de sodio al 1 y 6%, Biopure MTAD<sup>®</sup>, clorhexidina al 2%, REDTA<sup>®</sup> y Smearclear<sup>®</sup> sobre biopelículas de *E. faecalis*

elaboradas *in vitro*. Los períodos de tiempo fueron de 1 o 5 minutos, y al igual que Giardino *et al* <sup>(10)</sup> sus resultados indican que el hipoclorito de sodio al 6 y al 1% es un agente capaz de eliminar casi el 100% de la totalidad de la biopelícula, seguido del Smearclear<sup>®</sup>, la clorhexidina al 2%, el REDTA<sup>®</sup> y por último el Biopure MTAD<sup>®</sup>. <sup>(11)</sup>

Estos autores señalan que al reconocer que el medio ambiente anaeróbico del SCR y la consecuente limitación de oxígeno molecular pueden aumentar la resistencia de la biopelícula a los agentes antimicrobianos, se requieren de más estudios donde se puedan reproducir estas condiciones anaeróbicas y así evaluar la sensibilidad antimicrobiana.<sup>(11)</sup>

Con relación a la capacidad antibacteriana de ciertos antibióticos sobre biopelículas formadas por *E. faecalis*, Lima *et al* <sup>(12)</sup> evaluaron la efectividad de medicamentos basados en antibióticos y en clorhexidina, en la eliminación de estas biopelículas. Las mismas fueron inducidas en filtros de membranas de nitrato celuloso con 1 día o 3 días de formación y quedaron embebidas por los medicamentos durante un día a 37°C.

Los medicamentos utilizados en este estudio se probaron en forma de gel y fueron los siguientes: (1) gluconato de clorhexidina al 2% con natrozole al 2% en agua destilada, (2) gluconato de clorhexidina al 2%, sulfato sódico dietilen-glicol al 1,25% y natrozole al 2% en agua destilada, (3) clindamicina al 2% con natrozole al 2% en agua destilada, (4) clindamicina al 2%, sulfato sódico dietilen-glicol al 1,25% y natrozole al 2% en agua destilada, (5) gluconato de clorhexidina al 2%, óxido de zinc al 15%, sulfato sódico dietilen-glicol al 1,25% y natrozole al 2% en agua destilada y (6) clindamicina al 2%, metronidazol al 10%, sulfato sódico dietilen-glicol al 1,25% y natrozole al 2% en agua destilada.<sup>(12)</sup>

En sus resultados pudieron observar que la asociación entre la clindamicina y el metronidazol redujo significativamente el número de células en la biopelícula formada en un día y, con relación a todos los medicamentos probados, aquellos que contenían clorhexidina al 2% fueron los únicos capaces de reducir en gran cantidad el número de células bacterianas de *E. faecalis* en ambas biopelículas.<sup>(12)</sup>

Estos autores señalan que la clorhexidina es una molécula catiónica que ejerce su efecto antibacterial interrumpiendo la

integridad de la membrana citoplasmática bacteriana, causando filtración de los contenidos intracelulares. En altas concentraciones, la precipitación del citoplasma bacteriano ocurre como resultado de la interacción entre la clorhexidina y las entidades fosfatadas, como adenosín trifosfato y los ácidos nucleicos. De allí que los medicamentos que contienen clorhexidina sean capaces de eliminar casi la totalidad de microorganismos presentes en las biopelículas.<sup>(12)</sup>

Portenier *et al* <sup>(1)</sup> señalan que existen tres hipótesis que pueden explicar la resistencia de estas biopelículas a los antibióticos. La primera hipótesis se refiere a la reducción o baja penetración del medicamento a través de la misma; la segunda se basa en los posibles cambios en el medio ambiente químico de la biopelícula y la tercera todavía está en discusión, pero sugiere que las sub-poblaciones de bacterias dentro de la biopelícula adquieren capacidad fenotípica diferente.

Muchos son los estudios que reflejan la presencia de *E. faecalis* en las infecciones endodónticas; sin embargo, el porcentaje de prevalencia de este microorganismo puede variar considerablemente si se utilizan métodos de cultivo tradicional o las nuevas técnicas de detección microbiológica como la

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) entre otras.

A continuación se expondrán con más detenimiento cada uno de los métodos de detección que han sido utilizados para evidenciar la presencia de *E. faecalis* en las infecciones endodónticas, así como los estudios que soportan los distintos porcentajes de prevalencia del mismo.

## **1.2 Métodos de detección de *Enterococcus faecalis***

Los primeros estudios microbiológicos de infecciones endodónticas fueron llevados alrededor de los años '60 usando el microscopio, técnicas de cultivo aeróbicas, y reacciones bioquímicas, para poder detectar e identificar los microorganismos preponderantes en dichas lesiones. Así han sido cultivadas más de 500 especies bacterianas provenientes de la cavidad oral. <sup>(13)</sup>

Numerosas investigaciones han revelado que las infecciones endodónticas son polimicrobianas constituídas, aproximadamente, por 3 a 12 especies de microorganismos cultivables de conductos radiculares infectados o abscesos periapicales. <sup>(1,13,14)</sup> Actualmente, las nuevas técnicas de

detección molecular son capaces de identificar numerosas especies adicionales de microorganismos asociados con dichas infecciones endodónticas. Estos métodos proporcionan una identificación precisa de los microorganismos a nivel del ADN y la detección de aquellos que no han podido ser cultivados.<sup>(13)</sup>

### **1.2.1 Cultivo y Observación Microscópica**

Esta técnica tradicional consiste en sembrar las muestras del conducto radicular utilizando medios para cultivo de microorganismos anaerobios estrictos y anaerobios facultativos, que indiquen las proporciones relativas de cepas presentes. Sin embargo, muy poco se sabe acerca de los factores específicos de crecimiento que son utilizados por numerosos microorganismos para sobrevivir, en cualquier medio ambiente, incluyendo el cuerpo humano, por lo que no se puede determinar con exactitud si se replican exactamente las condiciones necesarias para su crecimiento.<sup>(14)</sup>

Las principales ventajas de las técnicas tradicionales de cultivo están relacionadas con su naturaleza de amplio rango, lo cual hace posible la identificación de una gran cantidad de especies microbianas en una muestra. Además, el cultivo hace

posible la determinación de la sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos aislados, estudiar su fisiología y patogenicidad.

(14)

Sin embargo, las propuestas de identificación basadas en cultivo presentan numerosas limitaciones: (1) toma una cantidad determinada de tiempo identificar algunas cepas de microorganismos anaerobios, lo cual puede retrasar el tratamiento antimicrobiano, (2) presenta una baja sensibilidad, particularmente para aquellas cepas de microorganismos anaerobios, (3) su especificidad es baja y dependiente de la experiencia del microbiólogo, (4) presenta dependencia estricta en el modo de transporte de la muestra y (5) es laborioso y requiere de tiempo. <sup>(13,14,15)</sup>

A pesar de las condiciones dadas en los métodos de cultivo tradicionales para la detección de la microbiota endodóntica, algunos microorganismos no pueden ser cultivados por numerosas razones; entre ellas: (1) la ausencia de nutrientes esenciales o factores de crecimiento en los medios de cultivo artificiales, (2) la toxicidad del medio de cultivo *per se*, lo cual puede inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, (3) la

producción de sustancias inhibitorias del microorganismo solicitado por parte de otros microorganismos presentes en el medio ambiente mixto, (4) la dependencia metabólica de otras especies para el crecimiento y (5) el reposo bacteriano, el cual es un estado de baja actividad metabólica que desarrollan algunas bacterias bajo ciertas condiciones de estrés, como la falta de nutrientes. (1,3,14,15)

Una de las ventajas más importantes del microscopio es que provee una rápida y poco costosa información, pero las características morfológicas no son comúnmente adecuadas para identificar un microorganismo en cuanto a su especie. Además de esto, el microscopio tiene una sensibilidad y especificidad limitada para detectar microorganismos en muestras clínicas; esto se refiere a que se necesita de un número relativamente grande de células microbianas para que puedan ser observadas bajo el microscopio. (13,14)

Por todo esto, numerosos investigadores se vieron en la necesidad de ir mas allá en la búsqueda y detección de microorganismos presentes en las infecciones endodónticas; junto con el avance de la ciencia y la tecnología, la identificación de

estos microorganismos a través de métodos moleculares se ha hecho un procedimiento mucho más certero, exacto y específico donde se han podido detectar, además de las especies prevalentes hasta el momento, nuevas especies que también están involucradas en dichas infecciones endodónticas y que tienen una participación importante en la persistencia de las lesiones perirradiculares.

### **1.2.2 Métodos moleculares**

Las técnicas moleculares han reducido la dependencia de los laboratorios microbiológicos clínicos a los métodos basados en cultivos, dando paso a nuevas oportunidades de estudios microbiológicos. Para dichos métodos, los objetivos fundamentales para el procesamiento de la muestra son la liberación del ácido nucleico del microorganismo, mantener la integridad del mismo, mantener la muestra no infectada y remover las sustancias inhibitorias.<sup>(13)</sup>

Los métodos de diagnóstico moleculares presentan numerosas ventajas sobre otros métodos de identificación microbiana. Entre éstas tenemos: (1) detección no sólo de las especies cultivables sino también de las no cultivables, (2) alta

especificidad e identificación precisa de variedades microbianas con comportamientos fenotípicos ambiguos, incluyendo especies convergentes y divergentes, (3) detección de especies de microorganismos en muestras sencillas, sin la necesidad de cultivo, (4) alta sensibilidad, (5) menos tiempo de preparación para el estudio, (6) ofrecen un diagnóstico rápido, el cual es particularmente ventajoso en casos de enfermedades mortales o enfermedades causadas por el crecimiento lento de microorganismos, (7) no requieren de condiciones anaeróbicas cuidadosamente controladas durante su muestreo y transporte, lo cual es ventajoso desde que algunas bacterias anaerobias y otros microorganismos frágiles perdían la viabilidad durante su transporte y (8) pueden ser usados durante el tratamiento antimicrobiano. <sup>(14,15)</sup>

Las propuestas moleculares de identificación microbiana parten de la premisa de que ciertos genes contienen información relevante acerca de la identidad microbiana. Idealmente, el gen que va a ser usado como blanco para la identificación microbiana debe contener regiones que son únicas para su especie.<sup>(14)</sup> El gen 16S ADN-r está presente en casi todas las bacterias; éste presenta algunas regiones que son casi idénticas en todas las bacterias denominadas *regiones conservadas*, y otras regiones

que varían en secuencia de una especie a otra denominadas *regiones variables*. Las regiones variables en el gen 16S ADN-r son los únicos detalles que permiten la identificación bacteriana.<sup>(15)</sup> (Gráfico 3)

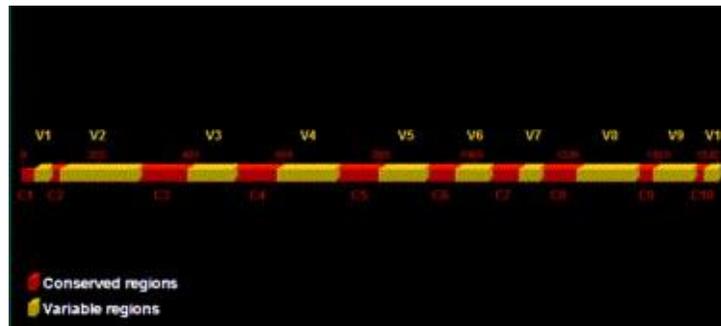


Gráfico 3. Dibujo esquemático del gen de ARNr 16S (ADNr). Las áreas amarillas corresponden a las regiones variables, las cuales contienen información acerca del género y la especie. Las áreas rojas corresponden a las regiones conservadas del gen. Tomado de Siqueira y Rocas. 2005.

Entre los métodos moleculares que han sido empleados para la detección del *E. faecalis* se encuentran la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y algunas variantes o ensayos derivados de esta tecnología como la transcriptasa reversa, entre otros. Todos ellos basados en la replicación *in vitro* del ADN del microorganismo.

#### 1.2.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El método molecular PCR está basado en la replicación *in vitro* del ADN a través de ciclos repetitivos de desnaturalización,

reunión de los cebadores y pasos de extensión. Así, el ADN blanco que sirve como plantilla se funde a temperaturas suficientemente altas como para desligar los puentes de hidrógeno pero manteniendo las cadenas juntas y de esta manera son liberadas cadenas simples de ADN. Posteriormente, dos oligonucleótidos cortos (cebadores) se reúnen en secuencias complementarias de cadenas opuestas del ADN blanco.<sup>(14,15,19,20)</sup>

El cebador (oligonucleótido) es una pequeña porción de ADN sintetizado, cuya función es complementar la secuencia de ADN de los genes microbianos que van a ser estudiados.<sup>(13)</sup> Los cebadores son seleccionados para rodear el material genético deseado, definiendo los dos puntos finales del fragmento de ADN que va a ser copiado. A una temperatura ligeramente mayor, la enzima ADN polimerasa se une a los cebadores y añade nucleótidos para extender la segunda cadena. En ciclos subsecuentes, se repiten los pasos de desnaturalización, reunión y extensión para hacer copias adicionales de ADN. Cada copia nueva sirve como plantilla para la amplificación en ciclos futuros. Luego de 30 ciclos, se han producido millones de copias de la secuencia blanco provenientes de una simple molécula inicial.<sup>(14,15,19,20)</sup> (Gráfico 4)

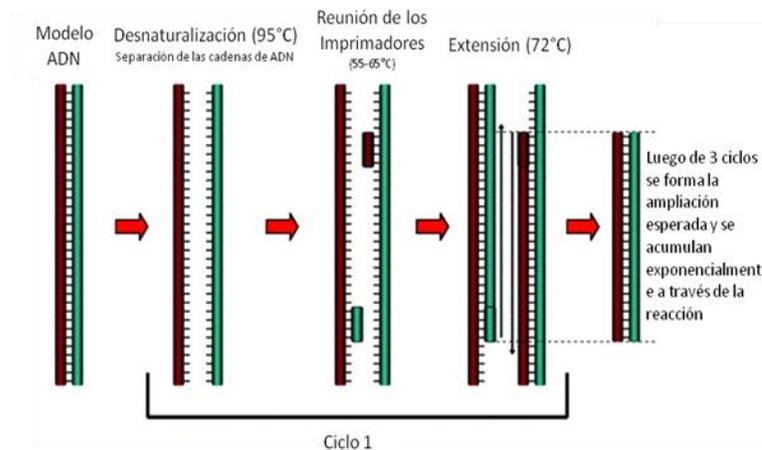


Grafico 4. Esquema del PCR. Tomado de Siqueira y Rocas. 2005.

En esta técnica molecular de detección microbiológica, son utilizados cebadores específicos para cada gen microbiano que va a ser estudiado y así obtener resultados más específicos y certeros.

Con relación a esto, Fouad<sup>(16)</sup> comparó la sensibilidad de tres cebadores diferentes usados en la literatura endodóntica para la detección de *E. faecalis* a través del método molecular PCR. Los cebadores utilizados fueron: grupo 1, cebadores basados en el gen *tuf* con una sensibilidad a nivel del género; y grupo 2 y 3, cebadores basados en el gen 16S ADN-r que son específicos para *E. faecalis*. Sus resultados señalan que los cebadores del grupo 1 presentaron la mayor sensibilidad, detectando las 3 cepas de *E. faecalis* a una baja concentración de  $10^2$  cel/mL en

todas las reacciones. El grupo 2 también detectó las 3 cepas del microorganismo pero a una concentración mayor, mientras que el grupo 3 fue el menos sensible e igual pudo detectar todas las cepas de *E. faecalis* pero a una concentración de  $10^6$  cel/mL.

Este autor señala que la sensibilidad de los cebadores usados en los estudios de prevalencia de microorganismos endodónticos es importante, sobre todo en casos de repetición de tratamiento, donde el número de microorganismos accesibles en el SCR suele ser bajo y un gran número de células microbianas pueden ser eliminadas durante la remoción del material de obturación.<sup>(16)</sup>

Por su parte, investigadores como Molander *et al*<sup>(17)</sup> desarrollaron un protocolo para la detección de *E. faecalis* y *E. faecium* a través de PCR. En este estudio fueron utilizados cebadores específicos de PCR sobre la región intergénica del 16S ADN-r y reacciones de PCR. La sensibilidad del sistema de PCR fue estudiada usando disoluciones seriadas de ADN bacteriano y células bacterianas de *E. faecalis*. En sus resultados apuntan que todas las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* producen perfiles de ampliación idénticos a las dos bandas mayores en posiciones correspondientes a los pares de

base 320 y 420; y que cuando se amplifica el ADN o hay una mayor purificación, se puede evidenciar una banda de 600 pares de bases. Gracias a sus resultados, estos autores apoyan el uso potencial de la tecnología PCR para la detección de *E. faecalis* y *E. faecium* en muestras de conductos radiculares.

En relación con *E. faecalis*, son diversos los resultados obtenidos con PCR en cuanto a su prevalencia en dientes con periodontitis apical persistente. Ejemplo de ello es el estudio realizado por Fouad *et al*<sup>(18)</sup>, donde utilizando el método PCR y secuencias moleculares, se pudieron evidenciar cepas de *E. faecalis* en 8 (22%) de 37 muestras, mientras que el estudio llevado a cabo por Siqueira y Rocas<sup>(19)</sup>, utilizando los mismos métodos de detección microbiológica, mostró dicho microorganismo en 17 (77%) de 22 muestras.

Así mismo, numerosos investigadores han estudiado la prevalencia de *E. faecalis* comparando métodos moleculares con técnicas de cultivo microbiológico tradicional. Autores como Sedgley *et al*<sup>(20)</sup> compararon el método de cultivo tradicional con PCR cuantitativo en Tiempo Real para detectar y cuantificar cepas de *E. faecalis*. Las muestras fueron obtenidas de conductos radiculares de dientes referidos a tratamiento

endodóntico por sospecha de una infección endodóntica persistente o en dientes donde ya había sido iniciado el tratamiento. Sus resultados señalan que este microorganismo fue detectado en 9 (10,2%) de 88 muestras endodónticas a través del cultivo, y en 70 (79,5%) de 88 muestras a través de PCR cuantitativo en tiempo real.

Estos autores señalan que aunque la data indica que el análisis microbiológico de muestras endodónticas por cultivo tradicional para *E. faecalis* puede ser insensible, la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real sólo identifica la presencia de secuencias específicas de ADN, y como consecuencia, el número de microorganismos intactos y viables es desconocido. Además afirman que a pesar de la alta capacidad de detección de los métodos moleculares mostrada en este estudio, se requiere de la combinación de ambas técnicas para un entendimiento completo del papel de *E. faecalis* en el proceso infeccioso del SCR. <sup>(20)</sup>

Por su parte, Gomes *et al*<sup>(21)</sup> y Sedgley *et al*<sup>(22)</sup> señalan haber detectado al microorganismo en cuestión en 23 de 100 muestras (23%) y en 3 de 41 muestras (7,3%) por métodos de cultivo respectivamente; mientras que a través del método PCR se

encontraron en 79 de 100 muestras (79%) y en 29 de 41 muestras (70%) respectivamente. Estos autores demuestran la alta sensibilidad de la técnica de PCR sobre el cultivo para la detección de *E. faecalis*.

#### **1.2.2.2 Transcriptasa reversa PCR**

El método de transcriptasa reversa PCR fue desarrollado para amplificar los ARN blanco y aumentar el uso de la enzima transcriptasa reversa, la cual puede sintetizar una cadena de ADN complementaria de un modelo de ARN. La mayoría de los ensayos de transcriptasa reversa PCR proponen dos pasos. En el primero, la transcriptasa reversa convierte el ARN en una simple cadena complementaria de ADN. En el segundo paso se añaden los cebadores para PCR, el ADN polimerasa y los nucleótidos para crear la segunda cadena complementaria de ADN. Una vez que la doble cadena complementaria de ADN está formada, ésta puede ser utilizada como modelo para la amplificación como un PCR convencional.<sup>(14)</sup>

Esta variación o ensayo de la técnica original PCR también ha sido utilizada para la detección de microorganismos presentes en el SCR, entre ellos *E. faecalis*. Williams *et al*<sup>(23)</sup> compararon la presencia de este microorganismo utilizando tres métodos de

detección microbiológica: cultivo, PCR cuantitativo en tiempo real y Transcriptasa reversa PCR. Se tomaron tres muestras: S1, luego del acceso coronal, S2, luego de la instrumentación e irrigación y S3, luego de la medicación intraconducto con hidróxido de calcio, de 29 dientes a estudiar, es decir, 87 muestras en total.

Los resultados señalan que *E. faecalis* fue hallado en 3 dientes (10,3%) por el método de cultivo tradicional, y en 16 dientes (55,1%) por la técnica molecular PCR cuantitativo en tiempo real. A su vez, todas las cepas de *E. faecalis* halladas por PCR cuantitativo fueron positivas al examen con transcriptasa reversa PCR. Estos autores concluyen que ambos métodos de detección molecular son mucho más sensibles que el cultivo tradicional para la detección de microorganismos en muestras clínicas endodónticas.<sup>(23)</sup>

Sin embargo, estos ensayos moleculares derivados del PCR presentan algunas limitaciones: (1) la mayoría de los ensayos de PCR usados con propósitos de identificación cualitativa, detectan al microorganismo en cuestión, más no su nivel en la muestra. Los resultados cuantitativos, sin embargo, pueden ser obtenidos por ensayos de PCR en tiempo real, (2) en aquellos

microorganismos con paredes celulares gruesas, como los hongos, pueden llegar a ser difíciles de romper y podrían requerirse pasos adicionales para la lisis y consecuente liberación de ADN, (3) existe una alta posibilidad de que se obtengan resultados falsos positivos, debido a la amplificación por PCR de un ADN contaminado y (4) pueden ocurrir falsos negativos debido a la presencia de enzimas inhibitorias o nucleasas en las muestras clínicas, lo cual podría retrasar la reacción de amplificación y degradar la plantilla de ADN, respectivamente. <sup>(14,15,19)</sup>

A pesar de dichas limitaciones está demostrado que las técnicas moleculares y los ensayos derivados de las mismas, son herramientas importantes en la nueva era de detección microbiológica, donde se conoce la existencia de microorganismos que no son cultivables y que sólo pueden ser detectados a través de técnicas más específicas y sensibles como el PCR. Por ende, al identificar los principales microorganismos asociados a las infecciones endodónticas, se pueden agotar todos los recursos indispensables para la erradicación de los mismos y así garantizar una terapia mucho más predecible con resultados más acertados.

### 1.3 Factores de virulencia de *Enterococcus faecalis*

La virulencia es la capacidad relativa de un microorganismo para producir alteraciones patológicas en el hospedero; esta propiedad se relaciona con la capacidad del mismo para colonizar al hospedero y con la de producir un daño tisular. La virulencia depende pues de diversos aspectos que afectan a estas capacidades y se denominan factores de virulencia.<sup>(34)</sup>

(Gráfico 5)



Gráfico 5. Factores de Virulencia. Tomado de Liebana Urena J.

1997

*E. faecalis* posee un gran número de factores de virulencia que le permiten la colonización del hospedero y de la matriz extracelular, la competencia con otras bacterias, resistencia en

contra de los mecanismos de defensa del hospedero, y la producción de cambios patológicos directamente a través de la producción de enzimas tóxicas o indirectamente a través de la inducción de inflamación. <sup>(1,2)</sup>

Entre los factores de virulencia más importantes presentes en *E. faecalis* se encuentran: la sustancia de agregación, las adhesinas o proteínas de superficie, las feromonas sexuales, el ácido lipoteicoico, el superóxido extracelular, la gelatinasa, la hialuronidasa y la citolisina, entre otros. Cada uno de estos factores de virulencia desempeña un papel específico dentro del crecimiento, desarrollo y supervivencia de *E. faecalis* en medios ambientes hostiles y con poca cantidad de nutrientes y oxígeno, por lo que a continuación se profundizará en cada uno de estos factores y se describirán sus funciones específicas.

### **1.3.1 Sustancia de agregación**

La sustancia de agregación es una adhesina bacteriana plásmido-codificada receptiva a las feromonas que media el contacto eficiente entre el donador y la bacteria receptora; ésta sustancia convierte la superficie de la bacteria donadora en una superficie adherente potencial para las células receptoras, causando agregación o agrupación y a su vez facilitando el

intercambio de plásmidos.<sup>(1,2,4)</sup> Mientras que la sustancia de agregación es expresada por la célula donadora, el proceso de conjugación bacteriana requiere que la “sustancia vinculante” sea expresada en la superficie de la célula receptora. En este sentido, tanto el material genético como la resistencia antibiótica pueden ser transferidos de las cepas de *E. faecalis* a otras especies.<sup>(1,2)</sup>

La sustancia de agregación puede servir como determinante de virulencia a *E. faecalis* en, al menos, cuatro formas: (1) juega un papel importante en la diseminación de los factores de virulencia codificados por plásmidos, como la citolisina enterocócica y determinadas resistencias antibióticas, entre las especies, (2) esta sustancia de agregación facilita la adherencia de *E. faecalis* a las células epiteliales renales e intestinales, y a la colonización de estas superficies, (3) protege al microorganismo contra los leucocitos polimorfonucleares y de la lisis mediada por macrófagos. El mecanismo para esta protección puede deberse a una modificación de la maduración fagosomal y (4) la sustancia de agregación y las citolisinas tienen acciones sinérgicas, lo cual aumenta la virulencia; esto resulta en daño tisular e invasión tisular profunda.<sup>(1,24)</sup>

Además de su función adhesiva durante el proceso de conjugación bacteriana, ésta media la adhesión de *E. faecalis* a numerosas células eucariotas como las células renales tubulares y las células epiteliales intestinales. Igualmente, se ha comprobado que promueve directamente la vinculación independiente a las opsoninas de *E. faecalis* a los neutrófilos humanos mediante el sistema del complemento mediado por el receptor. Como consecuencia de este tipo especial de unión, la relación *E. faecalis* – sustancia de agregación ha mostrado ser resistente a la lisis por parte de los neutrófilos humanos, a pesar de la fagocitosis y la activación de los mismos. <sup>(2,24)</sup>

### **1.3.2 Adhesinas o proteínas de superficie**

*E. faecalis* presenta en su pared celular numerosas proteínas de superficie, cada una cumpliendo una función específica. Las más importantes son la proteína de superficie *Esp* y la *Ace*, ambas relacionadas con la formación de biopelículas y con la adherencia del microorganismo a las proteínas de la matriz extracelular y al colágeno tipo I y IV.

La proteína de superficie *Esp* es una proteína superficial larga de 1873 aminoácidos, sin ningún parecido estructural a las otras proteínas de superficie reconocidas. <sup>(25,26)</sup>

Fue en 1999 cuando Shankar *et al*<sup>(23)</sup> reportaron la identificación de esta proteína asociada a la pared celular de *E. faecalis*. Su nombre, *Esp*, se deriva de sus siglas en inglés *Enterococcal surface protein*. Estos autores sugieren que la presencia de la *Esp* pudiera ser la responsable del aumento de la capacidad hidrofóbica y así facilitar las interacciones de este tipo entre moléculas.

Dos años más tarde, en el 2001, Toledo-Arana *et al*<sup>(26)</sup> realizan un estudio donde evaluaron la acción de la proteína de superficie *Esp* en diferentes cepas aisladas de *E. faecalis* y analizaron los efectos producidos en los diferentes pasos de formación de la biopelícula a niveles microscópicos y macroscópicos. A su vez, compararon la proteína de superficie *Bap*, cuyo nombre proviene de *Biofilm associated protein*, que se encuentra en la pared celular de *S. aureus* con la *Esp* de *E. faecalis*, en cuanto a su influencia en la formación de biopelículas. Esta proteína *Bap*, en un estudio previo de los mismos investigadores, demostró ser una pieza fundamental en la formación de biopelículas por parte de este microorganismo.

Los resultados de esta investigación señalan que ambas proteínas de superficie (*Bap* y *Esp*) comparten el 33% de

igualdad secuencial y 50% de similitud secuencial a lo largo de toda la alineación.<sup>(26)</sup> (Gráfico 6)

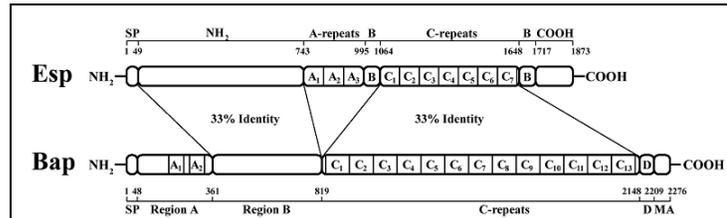


Gráfico 6. Similitud estructural entre las proteínas de superficie *Bap* y *Esp*. Se muestra el porcentaje de igualdad entre distintas regiones de estas proteínas. Tomado de Toledo-Arana et al. 2001

Por lo tanto, en cuanto a la habilidad en la formación de biopelículas, se evidencia una importante asociación entre la similitud de ambas proteínas y la presencia de la *Esp* en la pared celular de *E. faecalis*. La formación de biopelículas se vió restringida a las cepas aisladas de *E. faecalis* que presentaban *Esp*. Ochenta y siete (87) de 93 cepas de *E. faecalis* que presentaban *Esp*, fueron capaces de formar biopelículas *in vitro*. Por el contrario, ninguna de las cepas de este microorganismo que no poseían *Esp* en su superficie fueron capaces de formar biopelículas, indicando una asociación genética entre la presencia de la *Esp* y la presencia de adhesinas. Igualmente, estos autores apuntan que la *Esp* pudiese jugar un papel importante en la actividad de vinculación de los ligandos con la

matriz extracelular o tener una influencia indirecta en la modulación de ésta actividad en otras moléculas.<sup>(26)</sup>

Otra de las proteínas de superficie que se encuentra presente en la pared celular de *E. faecalis* es la proteína de Superficie Ace; ésta es una proteína vinculada al colágeno, es una molécula adherida a la matriz extracelular reconocida como un componente microbiano superficial, la cual media la adherencia a las proteínas de la matriz extracelular, al colágeno tipo I y IV y a la Laminina.<sup>(27)</sup>

Una investigación importante relacionada con la función de esta proteína es la realizada por Nallapareddy *et al*<sup>(27)</sup> quienes evaluaron la capacidad de mediar la adhesión de la proteína de superficie Ace de *E. faecalis* a las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo IV y la Laminina.

Ellos utilizaron cepas de *E. faecalis* mutadas y evidenciaron que la proteína de superficie Ace si interviene en la adhesión de la cepa OG1RF de *E. faecalis* al colágeno tipo IV y a la Laminina, así como también al colágeno tipo I. Además señalan que se pudiera pensar que esta proteína de superficie es la responsable

de la adhesión a estas tres proteínas de la matriz extracelular, debido a la reducción importante en la adhesión.<sup>(27)</sup>

Igualmente, Hubble *et al*<sup>(28)</sup> realizaron un estudio donde evaluaron la pérdida de adhesión de las cepas de *E. faecalis* a la dentina radicular cuando era mutada la proteína de superficie Ace. Ellos señalan que la dentina de los conductos radiculares está constituida por colágeno y por otras proteínas, por lo tanto debe existir una participación importante de esta proteína de superficie en la adhesión bacteriana, y a su vez, en la colonización del SCR. Sus resultados sugieren que la adherencia de la cepa de *E. faecalis* no mutada (OG1RF) fue significativamente mayor que la adhesión de las otras tres cepas de *E. faecalis* mutadas, por lo que se confirma la participación importante de la proteína de superficie Ace en la adhesión de *E. faecalis* en la dentina.

### **1.3.3 Feromonas sexuales**

Las feromonas sexuales son péptidos hidrofóbicos pequeños codificados cromosomalmente, a lo largo de 7 u 8 aminoácidos, los cuales promueven la transferencia conjugativa de plásmidos de ADN entre las cepas.<sup>(2,4)</sup> Se describen como feromonas porque

ellas obtienen una respuesta específica de unión de las células donadoras transportadoras de plásmidos.<sup>(4)</sup>

Normalmente, son secretadas simultáneamente múltiples feromonas por una cepa de *E. faecalis*. Adicionalmente a las feromonas, cada plásmido receptor de feromonas codifica un péptido secretado que actúa como inhibidor competitivo de su feromona correspondiente.<sup>(4)</sup>

Se ha señalado que algunas feromonas y sus péptidos inhibidores poseen el potencial de ofrecer funciones adicionales como quimiorreceptor a los neutrófilos, causando secreción enzimática granular e induciendo a una explosión respiratoria. A pesar de que *E. faecalis* secreta normalmente múltiples feromonas y los efectos quimiotácticos de las feromonas aparecen en bajas concentraciones, se desconoce por qué estos péptidos y sus inhibidores modulan significativamente la respuesta inflamatoria *in vivo*.<sup>(4)</sup>

#### **1.3.4 Acido lipoteicoico**

Los ácidos lipoteicoicos son un grupo de moléculas o polímeros anfipáticos íntimamente relacionados y asociados con la pared celular, que están constituidos por una columna central

de poliglicerolfosfato unida covalentemente a una porción glicolípídica hidrofóbica. <sup>(2,4)</sup>

Se ha reportado que los ácidos lipoteicoicos aislados de cepas de *E. faecalis* o de otras bacterias Gram positivas pueden estimular a los leucocitos a liberar numerosos mediadores, los cuales juegan un papel importante en varias fases de la respuesta inflamatoria. Entre ellos se incluyen la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8), la prostaglandina E2 (PGE2) y la liberación de enzimas lisosomales. <sup>(2)</sup>

Ehrenfeld *et al*<sup>(29)</sup> señalan que los ácidos lipoteicoicos han sido considerados como un componente de la sustancia vinculante de *E. faecalis*, los cuales actúan como un receptor en la célula receptora para la sustancia de agregación producida por la célula donadora. Esta conclusión proviene de experimentos donde ácidos lipoteicoicos libres aislados de *E. faecalis* inhiben grupos celulares inducidos por feromonas actuando como un inhibidor competitivo de la sustancia vinculante celular.

Por esto, los ácidos lipoteicoicos son considerados moléculas que ayudan a la virulencia de *E. faecalis* a través de la facilitación de formación agregada y la transferencia de plásmidos. <sup>(29)</sup>

### **1.3.5 Superóxido extracelular**

Los aniones superóxidos son radicales de oxígeno altamente reactivos relacionados con el daño tisular y celular en una gran variedad de desórdenes, incluyendo las enfermedades inflamatorias. <sup>(2)</sup>

Huycke *et al* <sup>(30)</sup> señalan que *E. faecalis* produce superóxido extracelular sustancial y especies derivadas del oxígeno reactivo como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radicales hidroxilos. Ellos evaluaron el daño producido por *E. faecalis* sobre el ADN de las células eucariotas, y observaron que las cepas de microorganismo donde hubo presencia de superóxido extracelular produjeron mayor daño sobre el ADN que aquellas cepas mutadas. Estos hallazgos sugieren que la producción de radicales libres extracelulares por parte de *E. faecalis* promueve la inestabilidad cromosomal y el daño causado en el ADN.

### **1.3.6 Gelatinasa**

La gelatinasa es una metaloproteinasa extracelular que contiene cinc, presente en *E. faecalis*, y fue descrita por primera vez en 1964. Puede hidrolizar gelatina, colágeno, fibrinógeno, caseína, hemoglobina, inulina, algunos péptidos relacionados con las feromonas sexuales y otros péptidos bioactivos. <sup>(2,4)</sup>

Con relación a esto, Hubble *et al*<sup>(28)</sup> realizaron un estudio donde evaluaron la pérdida de adhesión de las cepas de *E. faecalis* a la dentina radicular cuando eran mutadas fracciones de las proteasas serinas y la gelatinasa. Sus resultados señalan que se desconoce la participación independiente de la gelatinasa en la adhesión a la dentina radicular, debido a que en este estudio las cepas que mutaron por la acción de la gelatinasa también mutaron por la acción de la proteasa serina. Sin embargo, los péptidos y aminoácidos producidos tanto por la gelatinasa, como por la proteasa serina, pudieran ser una fuente importante de nutrientes para el crecimiento bacteriano dentro del SCR.

### **1.3.7 Hialuronidasa**

La hialuronidasa es un término general usado para describir enzimas que son capaces de descomponer el sustrato

hialuronidato (ácido hialurónico o hialuronano).<sup>(31)</sup> La hialuronidasa actúa como un ácido hialurónico, y es principalmente, una enzima degradativa que está asociada con daño tisular como consecuencia de su función.<sup>(2)</sup>

Otra función importante de esta enzima podría ser abastecer de nutrientes a los microorganismos, debido a que los productos de degradación de los sustratos son los disacáridos, los cuales pueden ser transportados y metabolizados intracelularmente por las bacterias.<sup>(31)</sup>

La hialuronidasa es considerada como facilitador de la proliferación bacteriana, así como de sus toxinas, a través de los tejidos del hospedero. Además de su propio efecto dañino, también es capaz de permitir los efectos deletorios de otras toxinas bacterianas, incrementando así la magnitud del daño.<sup>(2)</sup>

### **1.3.8 Citolisina (Hemolisina)**

La hemolisina, una enzima tóxica codificada por plásmidos, es producida por las cepas β-hemolíticas de *E. faecalis*. Es capaz de destruir eritrocitos, neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos, matar células bacterianas y reducir el acto de la fagocitosis.<sup>(1)</sup>

Jett *et al*<sup>(32)</sup> señalan que si las cepas de *E. faecalis* producen citolisinas, el efecto beneficioso combinado de la terapia antimicrobiana y anti-inflamatoria se vería completamente contrarrestado debido a la actividad organotóxica de esta sustancia, la cual destruye completamente el órgano a pesar de que los otros aspectos importantes de la infección estén satisfactoriamente controlados. Estos autores demuestran que aún en un órgano con respuesta inmune limitada, la enfermedad enterocócica cuenta con un componente inflamatorio importante, así como con un componente organotóxico si el organismo agresor es productor de citolisina.

Kayaoglu y Ørstavik <sup>(2)</sup> realizan un gráfico resumen que agrupa a los distintos factores de virulencia de *E. faecalis*, de acuerdo a la función que cumplen en la pared celular de dicho microorganismo. (Gráfico 7)



Gráfico 7. Tomado de Kayaoglu y Ørstavik. 2004

af Geijersstam *et al*<sup>(33)</sup> evaluaron las cepas de *E. faecalis* de SCR de dos poblaciones humanas diferentes, Lituania y Finlandia, comparando las propiedades de los factores de virulencia presentes en cada cepa. Se detectaron las proteínas de superficie *Esp*, *Ace* y *efaA* por PCR mientras que la presencia de citolisina y la gelatinasa fueron determinadas por la hidrólisis en agar sangre de caballo y agar gelatina, respectivamente. En sus resultados señalan que no hubo diferencias significativas entre las dos cepas de *E. faecalis* en cuanto a la presencia de proteína de superficie *Esp*, *Ace*, *efaA* y citolisina, mientras que fue mayor la producción de gelatinasa en el grupo de cepas finlandesas.

Estos autores señalan que la incidencia mayor de gelatinasa en las cepas provenientes de Finlandia, podría ser debido a que las muestras tomadas en esta población humana provenían de pacientes que presentaban síntomas clínicos o subjetivos al momento de la toma de muestra, a diferencia de las cepas de *E. faecalis* tomadas en la población humana de Lituania, cuya procedencia era de pacientes que presentaban periodontitis apical asintomática. Sin embargo, no presentan referencias bibliográficas que soporten esta teoría.<sup>(33)</sup>

## 2. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO

Los encargados de proveer defensas al hospedero no específicas pero importantes contra patógenos de cualquier tipo, son los fagocitos como neutrófilos, monocitos y macrófagos. Los neutrófilos, en particular, migran eficientemente hacia los sitios de la infección en respuesta a señales quimiotácticas, activan el sistema de complemento y los anticuerpos para el reconocimiento de los patógenos y causan la lisis de los microorganismos a través de su ingesta por mecanismos oxidativos y no oxidativos.<sup>(1,4)</sup>

Numerosos autores han investigado los mecanismos inmunológicos asociados con la resistencia a infecciones por los enterococos. Así, Harvey *et al*<sup>(35)</sup> investigaron los factores asociados a la susceptibilidad a infecciones por los enterococos presentes en el hospedero, especialmente en neonatales. Ellos utilizaron fuentes de suero y linfocitos polimorfonucleares en un ensayo bactericida de neutrófilos, para poder evaluar la contribución relativa de los anticuerpos y del sistema del complemento, así como sus interacciones, en la lisis de los enterococos mediada por neutrófilos.

Entre sus resultados señalan que: (1) el sistema del complemento desempeña un papel importante en la opsonización y fagocitosis de los enterococos, (2) los linfocitos polimorfonucleares de un neonatal sano son tan efectivos en la lisis de los enterococos mediada por neutrófilos como un linfocito polimorfonuclear de un adulto, (3) la actividad bactericida del neutrófilo mediada por el sistema de complemento sobre los enterococos puede proceder eficientemente por la vía alterna y (4) los anticuerpos específicos para los enterococos desempeñan un papel importante en la lisis del microorganismo mediada por neutrófilos, a través del aumento y aceleración del proceso. <sup>(35)</sup>

Estos autores señalan que la lisis de los enterococos por neutrofilos está mediada principalmente por el sistema del complemento, y que los anticuerpos desempeñan un papel menos esencial pero potencialmente importante. Los linfocitos polimorfonucleares de adultos y de infantes sanos funcionan de la misma manera en cuanto a eficiencia en la lisis de los enterococos por neutrofilos. <sup>(35)</sup>

Igualmente lo aseguran Gaglani *et al*<sup>(36)</sup> y Arduino *et al*<sup>(37)</sup> quienes estudiaron la interacción entre los enterococos y el

sistema de defensa del hospedero, así como la capacidad del sistema de complemento y de los anticuerpos en promover la lisis mediada por neutrófilos. Ambos grupos de autores concluyen que la lisis de los enterococos mediada por polimorfonucleares depende principalmente del sistema de complemento y que algunos anticuerpos específicos para este microorganismo, de humanos y de conejos, promueven la muerte celular mediada por polimorfonucleares aunque en menor grado; así mismo aseguran que los anticuerpos no son capaces de promover por sí mismos la lisis de los enterococos mediada por polimorfonucleares.

Arduino *et al*<sup>(37)</sup> señalan que existe una diferencia en cuanto a la sensibilidad a la lisis celular entre las dos especies de *Enterococcus* estudiadas, siendo las dos cepas de *E. faecium* más resistentes a la lisis mediada por neutrófilos. Esto es debido, según los autores, a factores asociados con la activación del sistema de complemento, la unión a los polimorfonucleares y a los sistemas intrafagosomales del microorganismo.

La lisis celular bacteriana mediada por el ataque complejo a la membrana no desempeña un papel importante en la respuesta

inmune de los enterococos, debido a la ausencia de membrana externa de todas las bacterias Gram positivas. <sup>(1)</sup> Sin embargo, ha sido estudiada la presencia de factores de virulencia como la sustancia de agregación y su relación con los componentes del sistema inmune humano. Así, Vanek *et al*<sup>(38)</sup> evaluaron la interacción entre la sustancia de agregación presente en *E. faecalis* con los neutrófilos humanos, componente importante en el sistema de defensa del hospedero. Estos autores señalan que la sustancia de agregación promueve un incremento marcado en lo que respecta a la unión bacteriana independiente de las opsoninas a los polimorfonucleares.

Estos autores afirman que la adhesión va a ser dependiente de la expresión de la proteína Asc10 ubicada en la superficie de los enterococos. Además, señalan que la CR3, anticuerpo monoclonal ubicado en la superficie de los linfocitos polimorfonucleares, desempeña un papel importante en la adhesión bacteriana mediada por la sustancia de agregación, disminuyendo la adhesión en un 85%.<sup>(38)</sup>

### 3. INCIDENCIA DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EN LAS INFECCIONES ENDODÓNTICAS

Hace más de 4 décadas, Kakehashi *et al*<sup>(39)</sup> reportaron que las bacterias y sus productos eran considerados como los agentes etiológicos primarios de la necrosis pulpar y de las lesiones periapicales. Ellos observaron que no se desarrolló periodontitis apical en ratas gnotobióticas (libres de gérmenes) cuando expusieron las pulpas de los molares a la cavidad oral, en comparación con las ratas controles con microflora oral convencional, donde si hubo desarrollo de lesiones periapicales.

Una gran cantidad de estudios e investigaciones indican que las enfermedades perirradiculares son desórdenes de tipo infeccioso. La lista de microorganismos involucrados en las enfermedades perirradiculares aumenta día a día, y tiene el potencial de aumentar más en los próximos años gracias a los avances de los métodos moleculares en cuanto a identificación y detección de microorganismos.<sup>(13,14,15,19,40)</sup>

Sundqvist y Figdor<sup>(41)</sup> señalan que un microorganismo patógeno endodóntico está definido como aquel capaz de inducir

destrucción de tejidos en la periodontitis apical. Los dientes con periodontitis apical se caracterizan por presentar una infección polimicrobiana y, mientras algunos microorganismos específicos desempeñan diferentes funciones o dominan los distintos estadios de la infección, no existe evidencia de que existan otros que no se encuentren involucrados en la patogénesis de la periodontitis apical.

En esencia, una infección endodóntica no es más que la infección del SCR del diente, siendo ésta el agente etiológico primario de las diferentes formas de enfermedades inflamatorias perirradiculares. Luego que se ha establecido la infección endodóntica, estos microorganismos entran en contacto directo con los tejidos perirradiculares a través del foramen apical o foraminas accesorias, ocasionando daño a estos tejidos y a la vez suscitando cambios inflamatorios.<sup>(14)</sup>

Distintos autores en sus investigaciones señalan la presencia de *E. faecalis* en las infecciones endodónticas, bien sean infecciones primarias o infecciones persistentes; por ello, se revisarán a continuación aquellos estudios que soportan la prevalencia del mismo en ambos tipos de infección.

### **3.1 Dientes con infección primaria**

La infección del SCR es un proceso dinámico y distintas especies microbianas dominan los diferentes estadios del mismo. Los factores más importantes que manejan el desarrollo de este proceso son la disponibilidad de nutrición, los niveles de oxígeno molecular y el pH local dentro del SCR. Los nutrientes exógenos, como los carbohidratos fermentados, pueden afectar la ecología microbiana de la porción coronal del conducto radicular expuesto, pero las proteínas y glicoproteínas endógenas son los principales nutrientes dentro del SCR.<sup>(41)</sup>

Las infecciones endodónticas primarias o los dientes no tratados endodónticamente con necrosis pulpar, se caracterizan por presentar una microbiota mixta o polimicrobiana, compuesta principalmente por microorganismos Gram positivos y Gram negativos, con predominio de bacterias anaerobias. Generalmente se pueden encontrar más de tres especies distintas de microorganismos dentro de un conducto radicular.<sup>(42,43,44)</sup>

Baumgartner y Falkler<sup>(45)</sup> cultivaron e identificaron los microorganismos que se encontraban presentes en los 5mm apicales de los conductos radiculares, de dientes con caries coronal y en las lesiones periapicales inflamatorias asociadas a estos. Realizaron cultivos aeróbicos y anaeróbicos y concluyeron que hay mayor predominio de microorganismos anaerobios en los últimos 5mm apicales. La presencia de *E. faecalis* se evidenció en 4 de las 10 muestras (40%).

Siqueira y Rocas<sup>(43)</sup> analizaron una recopilación de estudios que evalúan la microbiota presente en infecciones endodónticas primarias, tomando en cuenta la sintomatología presente. Especies de microorganismos como *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema dentícola*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Tanerella forsythia*, entre otros, fueron los que se encontraron en mayor porcentaje en las infecciones endodónticas primarias. Cepas de *E. faecalis* también fueron observadas en dichos estudios. Los porcentajes de prevalencia varían desde 30% aproximadamente en infecciones endodónticas asociadas con lesiones perirradiculares asintomáticas (Gráfico 8), hasta 5%

aproximadamente en infecciones endodónticas asociadas con periodontitis apical aguda. (Gráfico 9)

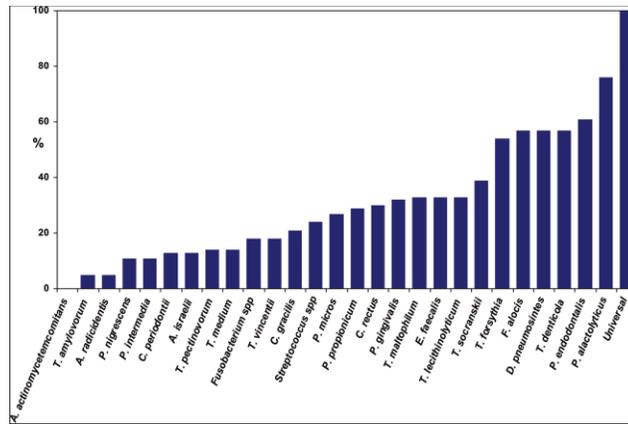


Gráfico 8. Especies prevalentes asociadas a lesiones perirradiculares asintomáticas de dientes no tratados. Tomado de Siqueira y Rôcas. 2005

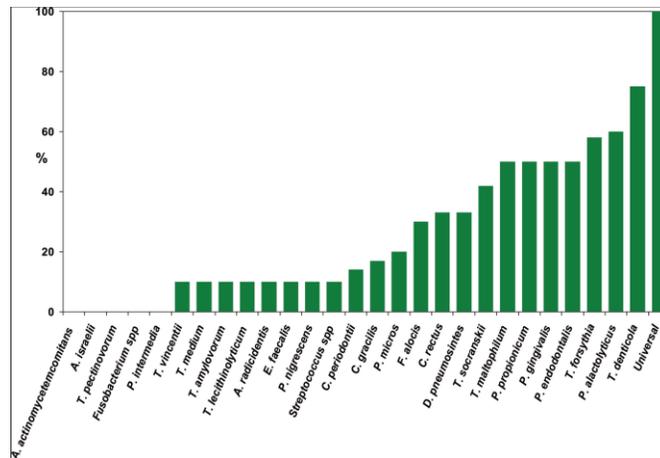


Gráfico 9. Especies prevalentes en dientes con periodontitis apical aguda. Tomado de Siqueira y Rôcas. 2005

Siqueira *et al*<sup>(46)</sup> evaluaron la prevalencia de *E. faecalis* en infecciones endodónticas primarias usando un método genético

molecular. Las muestras fueron seleccionadas de 53 dientes infectados, donde 27 casos fueron diagnosticados como abscesos perirradiculares agudos. Los resultados señalan que *E. faecalis* se encontró en 4 de 53 muestras (7.5%). Respecto a las lesiones asintomáticas, *E. faecalis* se encontró en un 11.5%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Lana *et al*<sup>(47)</sup>, Gomes *et al*<sup>(44)</sup> y Fouad *et al*<sup>(48)</sup> donde confirman la baja incidencia de este microorganismo en infecciones endodónticas primarias (4, 10 y 14% respectivamente).

En este mismo sentido, Rôcas *et al*<sup>(49)</sup> realizaron un estudio donde investigaron la prevalencia de *E. faecalis* en infecciones endodónticas y su asociación con las diferentes formas de enfermedades perirradiculares. Su muestra consistió en 80 casos los cuales fueron agrupados de acuerdo al diagnóstico clínico: (1) 21 casos de dientes no tratados con lesiones perirradiculares crónicas asintomáticas, (2) 10 casos diagnosticados como periodontitis apical aguda, los cuales mostraban sensibilidad a la percusión y dolor espontáneo de moderado a severo, usualmente exacerbado por la masticación, (3) 19 casos diagnosticados como abscesos perirradiculares agudos, los cuales mostraban tumefacciones localizadas o difusas cursando con fiebre,

linfadenopatías o malestar; no se observó comunicación aparente entre el absceso y la cavidad bucal o la piel y (4) 30 casos de dientes con tratamiento de conductos asociados a lesiones perirradiculares crónicas asintomáticas que fueron seleccionados para retratamientos.

El análisis de presencia del microorganismo y su prevalencia en los distintos estadios fue realizado mediante el método PCR; en casos de infecciones endodónticas primarias, la detección de *E. faecalis* fue de 33% (7 de 21) de los conductos radiculares asociados con lesiones perirradiculares crónicas asintomáticas, en 10% (1 de 10) de los conductos con periodontitis apical aguda y en 5% (1 de 19) de las muestras tomadas de abscesos perirradiculares agudos. Estos resultados demuestran que *E. faecalis* estuvo significativamente más asociado con casos asintomáticos que los sintomáticos. En general, *E. faecalis* estuvo presente en 18% (9 de 50) de los casos con infección endodóntica primaria.<sup>(49)</sup> (Gráfico 10)

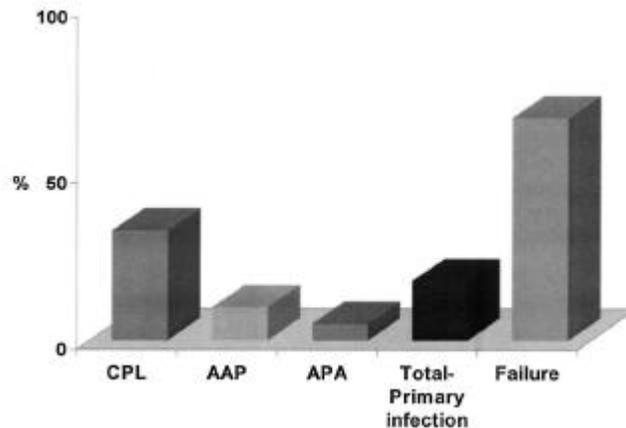


Gráfico 10. Prevalencia de *E. faecalis* en infecciones endodónticas asociadas con diferentes formas de enfermedades perirradiculares. AAP: periodontitis apical aguda. APA: absceso perirradicular agudo. CPL: lesión perirradicular crónica. Tomado de Rôcas *et al.* 2004.

### 3.2 Dientes con periodontitis apical persistente

Para que los microorganismos puedan mantener una periodontitis apical y causar una enfermedad post-tratamiento, ellos deben, además de poder sobrevivir dentro de los conductos radiculares ya obturados, poseer las propiedades patogénicas necesarias para perpetuar la inflamación externa del SCR. En general, los microorganismos involucrados en infecciones persistentes implementan una de las tres estrategias para evadir la respuesta inmune: secuestación, evasión celular o evasión humoral. La secuestación constituye una barrera física entre el microorganismo y el hospedero. La evasión celular significa que

los microorganismos evaden los mecanismos antibacterianos dependientes de los leucocitos y la evasión humoral significa que la bacteria extracelular evade los anticuerpos y el sistema de complemento del hospedero.<sup>(41)</sup>

Los microorganismos persistentes en los conductos radiculares son aquellos que se encuentran en las pulpas necróticas y sobreviven a los procedimientos biomecánicos, los cuales pueden estar ubicados en conductos no localizados o áreas no instrumentadas de los conductos. Así mismo, las bacterias provenientes de la cavidad bucal pueden colonizar el interior de los conductos radiculares durante el tratamiento por un inadecuado control aséptico, o invadir la obturación de los mismos por filtración coronal luego de la terapia endodóntica.<sup>(42)</sup>

Estudios recientes, usando técnicas microbiológicas avanzadas para especies anaerobias, han demostrado que la composición microbiana del SCR luego de un fracaso de tratamiento de conducto, difiere de aquella encontrada en dientes con necrosis pulpar no tratados. La microbiota encontrada en dientes con tratamiento de conductos previo y periodontitis apical se caracteriza por una mono infección

(presencia de 1 o dos especies) con predominio de microorganismos Gram positivos, y mayormente especies anaerobias facultativas.<sup>(42,43,44)</sup>

Molander *et al*<sup>(50)</sup> señalan que los microorganismos anaerobios facultativos son menos sensibles a las terapias antimicrobianas que los microorganismos anaerobios estrictos, y gracias a esto persisten con mayor frecuencia en el SCR luego de procedimientos endodónticos inadecuados. Estos microorganismos pueden sobrevivir, en una fase inactiva, con una actividad metabólica baja por un período determinado de tiempo, y factores como la filtración coronal durante o después del tratamiento de conducto pudiesen cambiar las condiciones nutricionales y desencadenar el crecimiento bacteriano.

Algunos de los rasgos fisiológicos requeridos por el microorganismo para entrar y establecerse por primera vez, son similares a los de los microorganismos que habitan una pulpa necrótica en un conducto no tratado, como por ejemplo la habilidad para encontrar nutrientes, competir con otros microorganismos y evadir las defensas iniciales del hospedero.<sup>(41)</sup> (Gráfico 11)

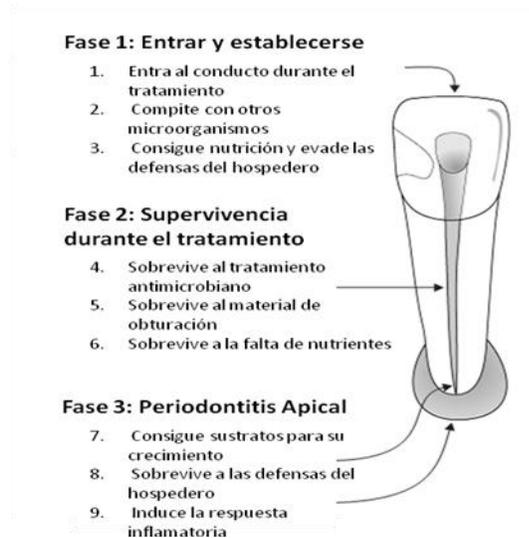


Gráfico 11. Estadíos importantes para el microorganismo involucrado en una infección persistente. Tomado de Sundqvist y Figdor.2003.

Numerosos estudios señalan a *E. faecalis* como el microorganismo prevalente de las lesiones endodónticas persistentes, con porcentajes que varían desde 12 a 77%. (43,49,51,52,53,54,55)

La habilidad de *E. faecalis* de causar enfermedades periapicales y fracasos crónicos en un diente tratado endodónticamente puede deberse a la habilidad de invadir los túbulos dentinarios y mantenerse viable dentro de ellos. Así lo comprueba Love<sup>(56)</sup> quien trata de identificar el posible

mecanismo que explique cómo *E. faecalis* puede sobrevivir y crecer dentro de los túbulos dentinarios, y a la vez reinfectar un conducto radicular obturado. Este autor colocó muestras del microorganismo en un caldo de infusión cerebro-corazón que contenía distintas cantidades de suero humano por un período de 56 días. La habilidad del microorganismo de penetrar en los túbulos dentinarios y de adherirse al colágeno tipo I presente en la dentina fue evaluado mediante la invasión dentinaria.

Este autor señala que los enterococos poseen numerosos factores de virulencia que lo ayudan a que pueda ocurrir esto, incluyendo la adherencia a las células del hospedero, la expresión de proteínas para asegurar su supervivencia celular como resultado de una fuente de nutrientes alterada, la habilidad de competir con otras células bacterianas y alterar la respuesta del hospedero y el medio ambiente.<sup>(56)</sup>

Los resultados de este estudio afirman que las células de *E. faecalis* se mantienen viables y mantienen su capacidad de invadir túbulos dentinarios y adherirse al colágeno en presencia de suero humano. Este mecanismo puede explicar por qué las células de *E. faecalis* dentro de los túbulos dentinarios actúan

como patógenos en fracasos de dientes tratados endodónticamente.<sup>(56)</sup>

La prevalencia de *E. faecalis* en infecciones endodónticas persistentes ha sido demostrada a través de numerosos estudios como se mencionó anteriormente. Algunos de estos estudios utilizan métodos de cultivo tradicionales para su detección, variando los porcentajes de prevalencia desde 30% hasta 70%.<sup>(42,51,52,53,55,57)</sup>

Es importante destacar el estudio realizado por Peciulienė *et al*<sup>(52)</sup> donde la muestra seleccionada de dientes con lesiones periapicales persistentes, fue tomada una primera vez cuando fue retirado el material de obturación presente en el SCR, y una segunda muestra tomada después de la preparación e irrigación con hipoclorito de sodio y EDTA. Del análisis de la primera muestra, de los 20 casos con presencia de microorganismos, *E. faecalis* estuvo presente en 14 dientes (70%); del análisis de la segunda, de los 7 casos con presencia de microorganismos, *E. faecalis* estuvo presente en 5 dientes (71%). Estos autores señalan que, más que el tratamiento químico llevado a cabo en los conductos, son verdaderamente importantes para la

presencia y desarrollo de *E. faecalis* las condiciones ecológicas presentes en conductos radiculares incompletamente obturados.

Otros estudios, en lugar de utilizar el método de cultivo tradicional, ponen en funcionamiento técnicas moleculares como PCR para la detección e identificación de *E. faecalis*, obteniendo rangos de prevalencia que van desde 12.1% a 77%.<sup>(49,54,58)</sup>

Kaufman *et al*<sup>(54)</sup> compararon la presencia de *E. faecalis* en dientes tratados endodónticamente con lesiones periapicales con aquellos dientes que también requieren de retratamiento, pero que no presentaban lesiones perirradiculares. Este segundo grupo de dientes iba a ser sometido a la repetición del tratamiento de conductos por presentar sospechas de filtración coronal o debido a la presencia de una restauración extensa donde la calidad del tratamiento anterior fuese cuestionable. La muestra consistió en 58 dientes en total, donde 22 no presentaban lesiones periapicales y 36 si las presentaban. Sus resultados señalan que *E. faecalis* fue encontrado en 7 de los 58 casos (12.1%); cinco de ellos fueron encontrados en dientes sin lesiones y dos en dientes con lesión apical.

Estos autores afirman que cuando ciertos factores inadvertidos son controlados, existe un número estadísticamente mayor de dientes sin lesiones perirradiculares que albergan a este microorganismo comparándolo con dientes con lesiones perirradiculares. Una explicación a esto podría ser que los dientes sin lesiones perirradiculares pueden estar en el proceso de formación de la misma, o éstas no son perceptibles radiográficamente.<sup>(54)</sup>

Por el contrario, autores como Siqueira y Rocas<sup>(58)</sup> realizaron un estudio donde investigaron las especies de microorganismos más frecuentemente aisladas de dientes con fracaso de la terapia endodóntica a través de PCR. Ellos encontraron que *E. faecalis* fue la especie más prevalente, detectada en el 77% de los casos. Las otras especies prevalentes fueron *P. alactolyticus*, *D. pneumosintes* y *F. alocis*. (Gráfico 12)

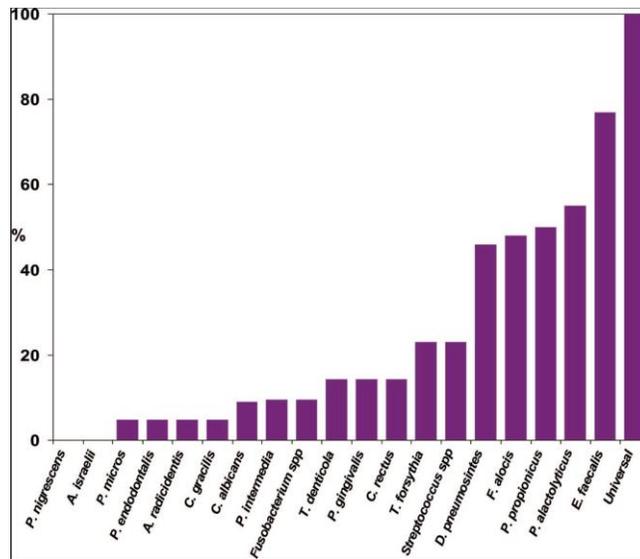


Gráfico 12. Especies prevalentes en dientes con tratamiento de conductos y lesiones perirradiculares crónicas. Data tomada de Siqueira y Rocas 2004. Imagen tomada de Siqueira y Rôcas. 2005

Así mismo, Rôcas *et al*<sup>(49)</sup> realizaron un estudio donde investigaron la prevalencia de *E. faecalis* en infecciones endodónticas y su asociación con las diferentes formas de enfermedades perirradiculares. *E. faecalis* fue detectado en 20 de 30 casos de infecciones endodónticas persistentes asociadas con dientes obturados (67%). Cuando se comparó la frecuencia de esta especie en 30 casos de infección persistente con 50 casos de infecciones primarias, los análisis estadísticos mostraron que estaba fuertemente asociado con la infección persistente.

Se han realizado numerosos estudios basados en la comparación de la prevalencia de *E. faecalis* cuando éste es detectado e identificado por métodos de cultivo tradicionales o por técnicas moleculares como PCR, así como también su presencia en infecciones endodónticas primarias o persistentes. *E. faecalis* ha sido mayormente asociado a infecciones endodónticas persistentes, siendo mayor el número de detección del microorganismo si se utilizan técnicas moleculares.

Así lo demuestran Gomes *et al*<sup>(59)</sup> quienes investigaron la presencia de *E. faecalis* en 50 dientes con infección endodóntica primaria y 50 dientes con infección endodóntica persistente mediante el cultivo tradicional y análisis por PCR. Los resultados señalan que *E. faecalis* fue detectado mediante cultivo en 2 (4%) de las 50 muestras de dientes con infección primaria y en 21 (42%) de las 50 muestras de dientes con infección persistente. En las infecciones primarias, *E. faecalis* estuvo presente como parte de las especies polimicrobianas, constituyendo un pequeño porcentaje de la microbiota total bacteriana. En las infecciones persistentes, en 14 de los 21 casos donde se evidenció su presencia, se encontró como única especie microbiana. Los resultados por técnicas moleculares PCR señalan la presencia de

*E. faecalis* en 41 (80%) de las 50 muestras en infecciones primarias y 38 (76%) de las 50 muestras en infecciones persistentes.

*E. faecalis* fue detectado en 23 de 100 muestras por técnicas de cultivo y en 79 de 100 muestras por PCR, mostrando la alta sensibilidad de PCR sobre los cultivos tradicionales. Los autores señalan que una de las razones por la que la detección del microorganismo fue tan elevada cuando se utilizó PCR fue la filtración coronal. En este estudio, la mayoría de los dientes con necrosis pulpar (49 de 50) presentaban filtración coronal por restauraciones defectuosas, caries o dientes no sellados coronalmente. La microfiltración coronal es una de las vías de penetración del *E. faecalis* hacia el espacio pulpar, si éste está presente en otra región de la cavidad bucal.<sup>(59)</sup> (Gráfico 13)

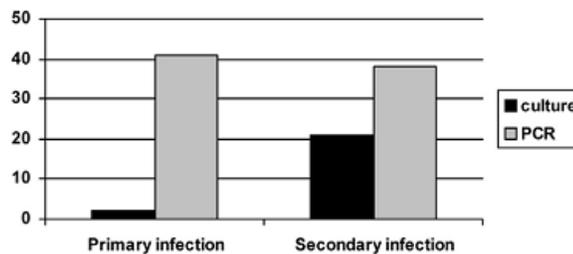


Gráfico 13. Detección de *E. faecalis* usando las técnicas de cultivo y PCR. Tomado de Gomes et al. 2006.

Otro de los métodos moleculares utilizados para la detección de *E. faecalis* es el método PCR cuantitativo en tiempo real. Williams *et al*<sup>(22)</sup> y Sedgley *et al*<sup>(23)</sup> utilizaron este método y lo compararon con el cultivo tradicional, concluyendo que es una prueba con mayor sensibilidad al microorganismo que las técnicas tradicionales.

Los resultados de ambos grupos de investigadores señalan prevalencia de *E. faecalis* de 10% por cultivo y de 55-80% por PCR cuantitativo en tiempo real. Así mismo, corroboran la mayor incidencia de este microorganismo en dientes con infecciones endodónticas persistentes comparados con dientes con infecciones endodónticas primarias.<sup>(22,23)</sup>

Es importante destacar la investigación de Gomes *et al*<sup>(44)</sup> donde además de evaluar la presencia de *E. faecalis* en infecciones endodónticas primarias y persistentes, se asocia al microorganismo con signos y síntomas específicos de estas infecciones. Las muestras fueron tomadas de 60 conductos radiculares, 41 con necrosis pulpar (infecciones primarias) y 19 con fracasos endodónticos (infecciones persistentes). Los

resultados señalan que *E. faecalis* se evidenció en 2 dientes con infección primaria y en 6 dientes con infecciones persistentes.

#### **4. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Uno de los objetivos biológicos de la terapia endodóntica es la eliminación de los microorganismos del SCR<sup>(1,5,12,14,39,40,50)</sup>. Debido a la anatomía compleja del mismo, una desinfección efectiva sólo se logra con una adecuada preparación biomecánica junto con la acción de los irrigantes antimicrobianos.

Como se ha mencionado anteriormente, *E. faecalis* ha sido asociado a las lesiones periapicales persistentes, y gracias a sus características fenotípicas y a la presencia de determinados factores de virulencia, este microorganismo es capaz de sobrevivir en medios con pocos o escasos nutrientes, así como de invadir espacios o aberraciones anatómicas donde acciones como la preparación biomecánica, la colocación de medicación intraconducto o la

utilización de irrigantes no son capaces de actuar y eliminarlo.<sup>(1,2,5)</sup>

A continuación se expondrán diversos estudios donde se trata de controlar la presencia de *E. faecalis* bien sea con medicación local como irrigantes o medicación intraconducto, con productos añadidos al momento de la obturación definitiva o con medicación sistémica como la utilización de antibióticos. También se revisarán algunos estudios experimentales donde se investiga el uso de terapias con irradiación con láser para la eliminación satisfactoria del microorganismo.

#### **4.1 Control microbiológico con medicación local**

##### **4.1.1 Irrigantes**

Muchos han sido los protocolos de irrigación utilizados para la erradicación de *E. faecalis* del SCR infectado. Entre los irrigantes mayormente usados se encuentra el hipoclorito de sodio (NaOCl), el ácido disódico etilendiaminotetraacético (EDTA), el MTAD<sup>®</sup>, el digluconato de clorhexidina y el ácido cítrico entre otros. A continuación los estudios que se han

llevado a cabo para comprobar la efectividad antimicrobiana sobre *E. faecalis* de cada uno de ellos.

#### **4.1.1.1 Hipoclorito de sodio**

El hipoclorito de sodio (NaOCl) ha sido utilizado como el irrigante de elección para la limpieza del SCR desde hace varias décadas, y en varias concentraciones, al 0,5%, 1%, 2% y 5,25%. Las principales ventajas que ha demostrado tener el NaOCl son su habilidad de disolución de tejidos orgánicos y su propiedad antibacteriana contra la mayoría de los microorganismos.

Siqueira *et al*<sup>(60)</sup> evaluaron *in vitro* la efectividad del NaOCl al 4% usando tres métodos de irrigación en la eliminación de *E. faecalis* del SCR. Los tres métodos fueron los siguientes: a) irrigación con 2ml de NaOCl y agitación con limas manuales; b) irrigación con 2ml de NaOCl y agitación ultrasónica; c) irrigación con NaOCl alternado con peróxido de hidrógeno; y el grupo control fue irrigado con solución salina. Sus resultados señalan que no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales; sin embargo, estos autores afirman que el

NaOCl, utilizado en cualquiera de estos tres métodos, fue significativamente más efectivo que la solución salina, al desinfectar los conductos radiculares.

A pesar de que está demostrado que el efecto mecánico de la irrigación reduce el número de bacterias en el conducto radicular, los hallazgos de este estudio sugieren que se requiere de una solución irrigante que posea acción antibacterial para maximizar la desinfección del SCR. De igual forma demuestran que no existe diferencia significativa entre los protocolos de irrigación utilizados. Los efectos observados en este estudio son dependientes del NaOCl más que del método de irrigación empleado.<sup>(60)</sup>

Otro grupo de autores como Abdullah *et al*<sup>(61)</sup> evaluaron la acción antimicrobiana del NaOCl al 3% en fenotipos diferentes de *E. faecalis*, como son una biopelícula y una suspensión planktónica. Cada una de las muestras del microorganismo fue expuesta al NaOCl en períodos de tiempo de 1,2,4,8,15,30 y 60 minutos. Los resultados señalan que el NaOCl fue capaz de lograr una reducción bacteriana al 100% cuando estuvo en contacto por 1 minuto con el microorganismo en su forma de

suspensión planktónica y en 2 minutos cuando se encontraba formando una biopelícula.

Estos autores apuntan que es difícil la erradicación de cualquier microorganismo que se encuentre en una biopelícula o en una suspensión planktónica *in vitro* si el agente antimicrobiano a utilizar no posee propiedades de disolución de tejido orgánico. Los mecanismos utilizados para la erradicación de las infecciones por biopelículas de *E. faecalis* se basan en la interrupción mecánica de la estructura multicelular, gracias a la instrumentación y disolución de los polímeros de la matriz utilizando NaOCl al 3% como protocolo principal de irrigación.<sup>(61)</sup>

En este mismo sentido, Sena *et al*<sup>(62)</sup> evaluaron la efectividad del NaOCl al 2,5% y al 5,25% sobre biopelículas de *E. faecalis*, así como biopelículas de *S. aureus*, *P. endodontalis* y *F. nucleatum*. Estas biopelículas eran inmersas en la solución irrigadora por 30 segundos, y luego por períodos de tiempo de 5,10,15,30 y 60 minutos, con y sin agitación mecánica.

En sus resultados señalan que se necesitaron 30 segundos de contacto, con agitación mecánica, entre la biopelícula de *E. faecalis* y el NaOCl al 5,25% para lograr su erradicación. Por otro lado, sin agitación mecánica, el NaOCl al 5,25% actuó sobre este microorganismo en la misma cantidad de tiempo, pero a una concentración de 2,5% tardó 60 minutos en lograr la erradicación del mismo.

Sena *et al*<sup>(62)</sup> afirman que los microorganismos Gram positivos anaerobios facultativos como los enterococos, son más resistentes a la instrumentación y a los agentes antisépticos, por lo que se puede esperar su persistencia dentro del SCR luego de una preparación biomecánica y obturación inadecuadas.

Por su parte, Vianna *et al*<sup>(63)</sup> y Gomes *et al*<sup>(64)</sup> evaluaron la efectividad antimicrobiana del NaOCl en concentraciones de 0,5, 1, 2,5, 4 y 5,25%, sobre *E. faecalis*. Ambos grupos de investigadores señalan que el tiempo requerido para la erradicación total del microorganismo fue inversamente proporcional a la concentración del mismo; así,

el NaOCl al 5,25% erradicó a *E. faecalis* en 15-30 segundos de contacto y a una concentración de 0,5% tardó 30 minutos.

#### **4.1.1.2 Digluconato de clorhexidina**

El digluconato de clorhexidina (CH) ha sido recomendado para la irrigación del SCR de dientes infectados debido a su acción antimicrobiana y a su absorción por parte de los tejidos dentarios duros con una liberación gradual y prolongada a niveles terapéuticos, llamado frecuentemente efecto residual o sustentividad. Sin embargo, la inhabilidad de la clorhexidina de disolver tejido orgánico ha sido un problema.<sup>(65)</sup>

En un estudio realizado por Dametto *et al*<sup>(65)</sup> se evaluó la actividad antimicrobiana del gel de CH al 2% sobre *E. faecalis*, comparándolo con otros irrigantes como la CH líquida al 2% y el NaOCl al 5,25%. Para evaluar la acción antibacteriana de dichos irrigantes, se tomaron tres muestras microbiológicas, una muestra inicial antes de la preparación biomecánica, una muestra intermedia inmediatamente después de la preparación y una muestra final 7 días después de la misma.

Los resultados señalan que al momento de la muestra intermedia, no hubo diferencias significativas en cuanto al irrigante utilizado y el número de colonias detectadas de *E. faecalis*; sin embargo, a los 7 días de la preparación biomecánica, ambos tipos de CH mostraron la menor cantidad de colonias formadas, muy por encima del NaOCl. Estos autores también apuntan que la CH, tanto en presentación líquida como en gel, es absorbida por el esmalte y la dentina luego de 7 días de la instrumentación e irrigación de los conductos radiculares, y a pesar de que el NaOCl fue igualmente efectivo en la exposición inicial, éste no presenta la propiedad de sustantividad. <sup>(65)</sup>

En este mismo sentido, Vianna *et al*<sup>(63)</sup> y Gomes *et al*<sup>(64)</sup> realizaron un estudio donde evalúan la efectividad antimicrobiana de la CH al 0,2%, 1% y 2% en líquido y gel sobre *E. faecalis*. Ambos coinciden en afirmar que el tiempo requerido para la erradicación total del microorganismo fue inversamente proporcional a la concentración del mismo; así, el gel de CH al 2% detuvo el crecimiento del microorganismo al minuto, y el líquido de CH al 2 % necesitó solo 15-30 segundos de contacto para su erradicación.

Sena *et al*<sup>(62)</sup> coinciden con los estudios de Vianna *et al*<sup>(63)</sup> y Gomes *et al*<sup>(64)</sup> en cuanto al tiempo de contacto que se requiere entre la CH y *E. faecalis*, para su erradicación. Estos autores evaluaron la acción antimicrobiana de la CH sobre una biopelícula del microorganismo en cuestión, y a los 30 segundos, se consiguió la eliminación total de *E. faecalis*.

#### **4.1.1.3 MTAD®**

El MTAD, cuyo nombre se origina de las palabras en inglés *Mixture of Tetracycline Acid and Detergent*, es un irrigante final del SCR constituido por una mezcla de un isómero de tetraciclina (doxiciclina), un ácido, y un detergente amonio cuaternario. Su presentación comercial se conoce como Biopure MTAD® <sup>(66,67)</sup>

Kho y Baumgartner<sup>(68)</sup> evaluaron y compararon la acción antimicrobiana de la irrigación con NaOCl al 1,3% y Biopure MTAD® y de NaOCl al 5,25% y EDTA en los 5mm apicales de dientes infectados con *E. faecalis*. El tiempo de irrigación final para ambos grupos fue de 2 minutos. En sus resultados no obtuvieron diferencias significativas en cuanto al número de

colonias formadas cuando se utilizaron los dos tipos de irrigación final.

A pesar de que los irrigantes pueden penetrar dentro de los túbulos dentinarios, no significa que la concentración de dichos irrigantes sea suficiente para eliminar todo tipo de microorganismo presente, y que la preparación biomecánica por sí sola no es capaz de erradicar al 100% la microbiota existente.<sup>(68)</sup>

Shabahang y Torabinejad<sup>(66)</sup> y Torabinejad *et al*<sup>(67)</sup> no obtienen los mismos resultados obtenidos por Kho y Baumgartner<sup>(68)</sup>; ambos grupos de investigadores utilizaron la misma metodología de estudio y en sus resultados obtuvieron que ninguna de las 15 muestras pertenecientes al grupo donde la irrigación final se hizo con Biopure MTAD<sup>®</sup> mostró crecimiento bacteriano luego de una semana.

Estos autores atribuyen estos resultados a la porción de doxiciclina presente en el Biopure MTAD<sup>®</sup>, entre cuyas propiedades están la actividad anticolagenasa, su bajo pH, su

capacidad de adherirse a la dentina y su capacidad de ser liberada con el tiempo. <sup>(66,67)</sup>

Con relación a las propiedades que presenta cada uno de los componentes del Biopure MTAD<sup>®</sup>, Krause *et al*<sup>(69)</sup> evaluaron el efecto antimicrobiano que presenta el Biopure MTAD<sup>®</sup> y dos de sus componentes por separado, la doxiciclina y el ácido cítrico, sobre *E. faecalis*. Utilizaron dos modelos de estudio *in vitro*, un modelo de diente bovino y un modelo de zonas de inhibición. Las muestras fueron irrigadas con 60µL durante un tiempo de 10 minutos.

Entre sus resultados señalan que en ambos modelos de evaluación, la doxiciclina fue el irrigante que mostró mejor efecto antimicrobiano sobre *E. faecalis*, en comparación con el ácido cítrico y el Biopure MTAD<sup>®</sup>. También acotan que la concentración de doxiciclina utilizada en el estudio fue al 10%, una concentración mayor que la que se encuentra presente en el Biopure MTAD<sup>®</sup> que es al 3%.<sup>(69)</sup>

A pesar de esto, los resultados de este estudio sugieren que la porción de doxiciclina presente en el Biopure MTAD<sup>®</sup> es la que provee el efecto antimicrobiano del irrigante, debido a que el ácido cítrico no fue lo suficientemente bactericida en ninguno de los dos modelos de estudio.<sup>(69)</sup>

Así mismo lo afirman Portenier *et al*<sup>(70)</sup> y Davis *et al*<sup>(71)</sup> quienes compararon la acción antimicrobiana del Biopure MTAD<sup>®</sup> con la CH al 2% sobre *E. faecalis*, resultando más efectivo el Biopure MTAD<sup>®</sup> en un período de 5 minutos. Davis *et al*<sup>(71)</sup> señalan que en su estudio no se evaluó la propiedad de sustantividad de la CH, sólo su habilidad de inhibir el crecimiento del microorganismo. Por tal razón, quizás clínicamente, la CH pudiera presentar mayor espectro antimicrobiano.

#### **4.1.2 Medicación intraconducto**

*E. faecalis* se ha caracterizado por tener la capacidad de sobrevivir en medios ambientes áridos y a numerosos protocolos de irrigación y medicaciones intraconductos. Muchos han sido los medicamentos probados para la erradicación del mismo, entre

ellos el hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ), el digluconato de clorhexidina (CH) y el paramonoclorofenol alcanforado.

#### 4.1.2.1 Hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ), descubierto por Herman en 1920<sup>(1,5)</sup>, ha sido la medicación intraconducto de elección para los dientes con lesiones perirradiculares persistentes. Sin embargo, numerosos estudios revelan la resistencia de *E. faecalis* a los efectos antibacterianos de dicha medicación.  
(72,73,74,75)

Con relación a esto, Evans *et al*<sup>(76)</sup> evaluaron los mecanismos a través de los cuales *E. faecalis* es capaz de sobrevivir al alto pH del  $\text{Ca(OH)}_2$ . Estos autores analizaron la respuesta de estrés de *E. faecalis* frente a agentes antimicrobianos exponiendo las células a concentraciones sub-letales de NaOCl y  $\text{Ca(OH)}_2$ . Sus resultados señalan que frente al  $\text{Ca(OH)}_2$  a un pH de 11,1 por 30 minutos, sólo el 0,4% de las células lograron sobrevivir; sin embargo, el aumento de los valores de pH a 11,5 resultó en una lisis celular completa.

La capacidad de ciertos microorganismos de producir una respuesta de estrés con síntesis de proteínas generales o específicas inducidas por la misma, forma parte de los mecanismos de supervivencia más importantes. La producción de estas proteínas es una respuesta biológica fundamental en numerosas especies bacterianas y protege a las células de situaciones adversas. Para comprobar la función de estas proteínas en la supervivencia de *E. faecalis* frente al pH alcalino del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , la producción de éstas fue bloqueada con cloranfenicol durante el pretratamiento y fue removido con la colocación del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .<sup>(76)</sup>

Estos autores refieren que el bloqueo de la producción de las proteínas inducidas por el estrés no tuvo efecto en la supervivencia celular, lo cual señala que la producción de proteínas inducidas por estrés no es realmente importante para la supervivencia de *E. faecalis* a un alto valor de pH.<sup>(76)</sup>

Por el contrario, Evans *et al*<sup>(76)</sup> señalan que el sistema de transporte de protones, lo cual lleva a los protones al interior de la célula para acidificar el citoplasma, sí cumple una función

critica en la supervivencia de *E. faecalis* frente a medios ambientes con pH alcalino. <sup>(76)</sup>

El  $\text{Ca(OH)}_2$  ha sido mezclado con diferentes vehículos con el fin de lograr aumentar sus propiedades antibacterianas y así erradicar los microorganismos prevalentes de las infecciones endodónticas persistentes. Con relación a esto, Cwikla *et al* <sup>(77)</sup> evaluaron la actividad antimicrobiana del  $\text{Ca(OH)}_2$  en tres presentaciones contra *E. faecalis*. Se utilizaron tres vehículos, agua destilada, potasio iodado y Metapex<sup>®</sup> compuesto por iodoformo y aceite de silicona. El período de estudio fue de una semana y sus resultados señalan que el grupo donde se evidenció la menor reducción bacteriana fue donde se utilizó el  $\text{Ca(OH)}_2$  solo.

Estos autores señalan que el  $\text{Ca(OH)}_2$  por sí mismo no fue efectivo en la erradicación del microorganismo a profundidades de 250 $\mu\text{m}$  dentro de los túbulos dentinarios; esto quizás es debido a la inhabilidad de la pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  de penetrar efectivamente dentro de ellos, resultando en una dosis sub-letal de agente antimicrobiano a esa profundidad. <sup>(77)</sup>

Sin embargo, Lynne *et al*<sup>(78)</sup> no concuerdan con los resultados de los estudios mencionados anteriormente. Estos autores evaluaron la actividad antimicrobiana del  $\text{Ca(OH)}_2$  en polvo por un período de 24 horas, comparándolo con la CH al 0,12% a distintas profundidades en túbulos dentinarios infectados con *E. faecalis*, y señalan que el grupo donde se utilizó  $\text{Ca(OH)}_2$  al 10% combinado con agua estéril fue el grupo donde se evidenció la menor cantidad de microorganismos en las tres profundidades estudiadas (de 89 a 94% de erradicación bacteriana).

Estos autores señalan que en su estudio queda demostrado que *E. faecalis* es capaz de penetrar profundamente dentro de los túbulos dentinarios luego de 24 horas. También señalan que las propiedades presentes en el  $\text{Ca(OH)}_2$  pueden verse afectadas por el vehículo utilizado; así, refieren que cuando es mezclado con CH, puede reducir la actividad antibacteriana del mismo afectando sus propiedades físicas y químicas.<sup>(78)</sup>

Siqueira *et al*<sup>(79)</sup> realizaron una serie de tres estudios donde evalúan el potencial de la irrigación con NaOCl al 2,5% y la utilización de tres medicaciones intraconducto diferentes. El primer estudio clínico se basó en la determinación de la

reducción bacteriana luego de la preparación químico-mecánica con NaOCl al 2,5% y medicación intraconducto con  $\text{Ca(OH)}_2$ . Se tomaron tres muestras, la primera al momento de iniciar la terapia endodóntica, la segunda luego de la preparación químico-mecánica con NaOCl, y la tercera luego de 7 días de medicación intraconducto con  $\text{Ca(OH)}_2$  mezclado con glicerina.

Los resultados de este estudio señalan que al momento de la primera muestra, todos los conductos radiculares presentaban microorganismos; en la segunda muestra, el 45,5% de los casos presentaban bacterias cultivables, mientras que en la tercera muestra sólo 2 casos (18,2%) resultaron positivos. Estos porcentajes confirman la reducción significativa en el número de bacterias de conductos radiculares infectados luego del protocolo usado y, a pesar de no considerarse una diferencia estadísticamente significativa entre las últimas dos muestras, una disminución de 30% en el número de casos con cultivos negativos hace razonable el uso del  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicación intraconducto.<sup>(79)</sup>

Muchos son los estudios donde se compara la efectividad antimicrobiana del  $\text{Ca(OH)}_2$  con la CH como medicación

intraconducto sobre *E. faecalis*, logrando con ésta última, mejores tasas de erradicación en dientes con lesiones perirradiculares persistentes. A continuación se presentan dichos estudios con el fin de analizar mejor las propiedades que posee la CH para lograr la erradicación de dicho microorganismo.

#### **4.1.2.2 Digluconato de clorhexidina**

El digluconato de clorhexidina (CH) a distintas concentraciones ha sido empleado como irrigante del SCR o como medicación intraconducto, sólo o combinado con  $\text{Ca(OH)}_2$  entre otros.

Numerosos estudios coinciden en afirmar que la CH posee mayor poder de erradicación de *E. faecalis* que el  $\text{Ca(OH)}_2$ .<sup>(72,73,74,75)</sup>

Autores como Lin *et al*<sup>(72)</sup>, Schafer *et al*<sup>(73)</sup>, Basrani *et al*<sup>(74)</sup> y Gomes *et al*<sup>(75)</sup> utilizaron la CH como medicación intraconducto por períodos de tiempo de 1 a 15 días y la compararon con muestras donde se utilizó el  $\text{Ca(OH)}_2$  solo o donde se

combinaban ambas medicaciones, logrando la erradicación total del microorganismo en aquellos grupos donde se utilizaba la CH sola. Igualmente, evaluaron la presentación en la que se encontraba el medicamento, en gel o líquido, y no encontraron diferencias significativas en cuanto a su efectividad.

Gomes *et al*<sup>(75)</sup> señalan que la combinación de ambas medicaciones fue efectiva sólo en cortos períodos de tiempo; esto se atribuye a su alto pH, sugiriendo un incremento en la capacidad iónica de la molécula de CH. Sin embargo, aunque la combinación incrementa el pH, el  $\text{Ca(OH)}_2$  puede disminuir la actividad antibacteriana de la CH posiblemente debido a la pérdida en su capacidad de adherirse a la pared celular de la bacteria.

Con relación a la capacidad antimicrobiana que presenta la combinación entre el  $\text{Ca(OH)}_2$  y la CH como medicación intraconducto, el segundo estudio realizado por Siqueira *et al*<sup>(80)</sup> confirma su potencial antibacteriano. Ellos evaluaron la reducción bacteriana luego de la preparación químico-mecánica usando CH al 0,12% y de la colocación de  $\text{Ca(OH)}_2$  mezclado con CH al 0,12% como medicación intraconducto. Igualmente

tomaron tres muestras a lo largo de toda la terapia endodóntica, y evidenciaron que luego de la preparación químico-mecánica hubo una disminución de 46,2% en el número de bacterias presentes, y luego de la medicación disminuyó a 7,7%.

Estos autores apuntan que la diferencia en cuanto al número de bacterias contadas entre la segunda y la tercera muestra fue estadísticamente significativa, por lo que sugieren el uso de otros antisépticos en conjunto con el  $\text{Ca(OH)}_2$  para aumentar su actividad antimicrobiana dentro del SCR.<sup>(80)</sup>

Las propiedades de la CH dentro de los túbulos dentinarios pueden verse aumentadas cuando se retira la capa de desecho de los mismos, gracias a la acción de quelantes que permitan su paso a través de ellos. Así lo demuestran Yan *et al*<sup>(81)</sup> quienes evaluaron la adhesión de *E. faecalis* a bloques de dentina que fueron tratados con EDTA al 17% y CH al 2% por 7 días y evidenciaron menor adhesión del mismos a las paredes dentinarias.

Yan *et al*<sup>(81)</sup> señalan que la CH a sido empleada como medicación intraconducto gracias a su propiedad de sustantividad, la cual se da por la liberación de moléculas cargadas positivamente provenientes de la dentina tratada con CH. Estas moléculas liberadas se adhieren a la bacteria, interfiriendo así con su adhesión a la dentina y causando daño en la membrana celular.

Mas recientemente, Paquette *et al*<sup>(82)</sup> en el 2007, evaluaron la eficiencia antibacteriana de la CH al 2% como medicación intraconducto *in vivo*. En este estudio se utilizaron 22 dientes con periodontitis apical persistente, se instrumentaron en una primera sesión y se medicaron con CH para ser evaluados 7 y 15 días después. Las muestras fueron obtenidas antes de acceder a la cámara pulpar y luego de la preparación biomecánica en una primera sesión, y antes y después de la irrigación con CH en una segunda sesión. Sus resultados señalan que a los 7 días de medicación se evidenció una disminución en el número de colonias formadas de un 3%, y a los 14 días de un 19%, lo cual no es una diferencia estadísticamente significativa.

Estos autores afirman que la CH líquida al 2% aplicada *in vivo* como medicación intraconducto de 7 a 15 días no disminuye el número de dientes con cultivos negativos o no reduce el número de bacterias contadas luego de haber realizado la preparación biomecánica en una primera sesión. A pesar de que el crecimiento bacteriano es menor comparado con otros estudios, los beneficios potenciales de la CH indicadas en estudios *in vitro*, no pudo ser demostrada *in vivo*.<sup>(82)</sup>

#### **4.1.2.3 Paramonoclorofenol alcanforado**

Los compuestos fenólicos han sido utilizados ampliamente en los tratamientos dentales como antisépticos y sedantes en aplicaciones tópicas en dentina y tejido pulpar. El paraclorofenol es sólido a temperatura ambiente y líquido en alcanfor. La adición del alcanfor causa una liberación lenta del paraclorofenol; esto hace que el medicamento sea menos caústico. Se ha encontrado que el paramonoclorofenol es citotóxico para las células del ligamento periodontal inhibiendo su viabilidad y proliferación, así como también es tóxico para las células pulpares y macrófagos causando inflamación tisular.<sup>(83)</sup>

Con relación al uso de compuestos fenólicos con otras medicaciones intraconducto, Sukawat y Srisuwan<sup>(84)</sup> compararon el efecto antibacteriano de tres fórmulas distintas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  sobre *E. faecalis*. Las mezclas utilizadas fueron  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  con agua destilada,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  con CH al 0,2% y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  mezclado con paramonoclorofenol (CMCP), en un período de tiempo de 7 días. Ellos concluyen que la pasta de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  mezclado con CMCP fue la medicación intraconducto más efectiva en este estudio. Luego de que el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se mezcla con CMCP, la sal cálcica paramonoclorofenolada libera paramonoclorofenol e iones hidroxilos, ambos bactericidas. Los compuestos fenólicos tienen una baja tensión superficial, por lo que fluyen fácilmente dentro de los túbulos dentinarios.

En el tercer estudio realizado por Siqueira *et al*<sup>(85)</sup> evaluaron la reducción bacteriana luego de la instrumentación e irrigación con NaOCl al 2,5% y medicación intraconducto con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  mezclado con CMCP. Igualmente se tomaron tres muestras, y sus resultados señalan que si hubo diferencia estadísticamente significativa entre la muestra tomada luego de la irrigación y preparación biomecánica y la muestra luego de 7 días de medicación intraconducto, 54,5 y 9,1% respectivamente.

Estos autores afirman que a pesar de la citotoxicidad conocida de los compuestos fenólicos, la respuesta de los tejidos periapicales a la medicación de  $\text{Ca(OH)}_2$  con CMCP es favorable. Ellos señalan que esta asociación probablemente deba su biocompatibilidad a la liberación lenta de CMCP de la pasta medicamentosa; el efecto desnaturalizante del  $\text{Ca(OH)}_2$  sobre los tejidos conectivos, el cual previene la penetración tisular del CMCP, reduce su toxicidad.<sup>(85)</sup>

#### **4.1.3 Durante la obturación**

Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de ciertos componentes que pueden ser utilizados al momento de la obturación definitiva del SCR, todo ello con la intención de erradicar la presencia de *E. faecalis* del interior de los mismos, bien sea añadido a los cementos selladores o a las puntas de gutapercha ya conocidas comercialmente.

##### **4.1.3.1 Puntas de gutapercha**

Las puntas de gutapercha con medicaciones en su composición han sido probadas en la erradicación de diversos microorganismos, dando resultados no muy satisfactorios. Así lo

comprueban Lui *et al*<sup>(86)</sup> y Dartan *et al*<sup>(87)</sup> quienes evaluaron la sensibilidad *in vitro* de *E. faecalis* a puntas de gutapercha que contienen  $\text{Ca(OH)}_2$  y CH. En ambos estudios, los resultados señalan la existencia de colonias bacterianas luego de 14 días de colocación de las puntas de gutapercha con medicamentos, lo que confirma la poca o nula actividad antimicrobiana que cumplen estos medicamentos dentro de las puntas de gutapercha. Lui *et al*<sup>(86)</sup> señalan que las puntas impregnadas con CH no poseen una actividad inhibitoria suficiente para eliminar microorganismos patógenos como es *E. faecalis* del interior de los túbulos dentinarios.

#### **4.1.3.2 Cementos selladores**

Distintos cementos selladores han sido estudiados para comprobar su actividad antimicrobiana sobre *E. faecalis*. Así lo reportan en el 2003 Mickel *et al*<sup>(88)</sup> quienes evaluaron 4 cementos selladores, entre ellos el Roth 811<sup>®</sup>, el Kerr EWT<sup>®</sup>, el Sealapex<sup>®</sup> y el AH Plus<sup>®</sup>. El efecto antibacteriano fue medido por zonas de inhibición creadas por los cementos selladores sobre el microorganismo. En sus resultados señalan que los cementos selladores que mostraron evidencia de zonas de inhibición fueron

el Roth 811<sup>®</sup>, el Sealapex<sup>®</sup> y el Kerr EWT<sup>®</sup>. Por el contrario, el AH Plus<sup>®</sup> no mostró zonas de inhibición sobre *E. faecalis*.

Estos autores señalan que los estudios *in vitro* no son la forma más adecuada de demostrar la eficacia antimicrobiana de los cementos selladores, ya que el ambiente dentro de los túbulos dentinarios es diferente a las placas de agar donde se llevaron a cabo los experimentos. Está comprobado que las bacterias pueden colonizar el interior de los túbulos dentinarios, por lo que el cemento sellador de elección debe poseer una alta capacidad de difusión para actuar como un agente antimicrobiano efectivo.<sup>(88)</sup>

Contrario a los resultados obtenidos por Mickel *et al*<sup>(88)</sup>, el grupo de investigadores encabezado por Saleh *et al*<sup>(89)</sup> señalan que el cemento sellador AH Plus<sup>®</sup> es efectivo en la erradicación de *E. faecalis* en un período de tiempo de 7 días, al igual que el cemento sellador de Grossman<sup>®</sup>.

Estos resultados muestran que el uso de estos cementos selladores erradica *in vitro* todos los microorganismos de los

túbulos dentinarios en un perímetro de 300µm dentro del conducto radicular.<sup>(88)</sup>

#### **4.1.4 Métodos experimentales**

Numerosos investigadores se han visto en la necesidad de buscar nuevas herramientas para la erradicación total de *E. faecalis*, entre las que destacan la utilización del láser y la desinfección fotoactivada no invasiva avanzada, entre otras. Así lo demuestran George y Kishen<sup>(90)</sup> quienes evaluaron la citotoxicidad y selectividad de la desinfección fotoactivada no invasiva avanzada (ANILAD) sobre *E. faecalis* y los fibroblastos localizados adyacentes al foramen apical.

El ANILAD, según señalan los autores es una terapia fotoactivada antimicrobiana avanzada que se lleva a cabo en dos pasos y se utiliza para la desinfección del SCR. En el primer paso, es aplicado el fotosensibilizador que facilita la difusión dentro de las complejidades anatómicas y los túbulos dentinarios. En el segundo paso, el medio de irradiación que contiene fluordecahidronaftaleno reemplaza parcialmente al fotosensibilizador en el conducto radicular. Cuando se irradia con

una longitud de onda apropiada, el medio de irradiación sirve como ducto óptico para transmitir la energía eléctrica a través del SCR.<sup>(90)</sup>

Los resultados *in vitro* y *ex vivo* mostraron que la citotoxicidad fue menor comparada con el NaOCl. Una dosis de radiación produjo un 97,7% de erradicación microbiana, mostrando sólo un 30% de disfunción de los fibroblastos. El ANILAD mostró un efecto bactericida dependiente de la concentración utilizada, con menores efectos tóxicos sobre las células fibroblásticas. Esta disminución en la citotoxicidad pudiese ser atribuída al corto tiempo de vida y la distancia mínima de difusión de los radicales libres de oxígeno.<sup>(90)</sup>

Por su parte, Eldeniz *et al*<sup>(91)</sup> compararon la eficacia antimicrobiana del NaOCl al 3% con la irradiación con láser Er,Cr:YSGG (erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet) en conductos radiculares infectados con *E. faecalis*. Este láser usa puntas de fibra endodónticas delgadas y flexibles de varios diámetros y longitudes, lo cual le facilita el acceso a los tejidos pulpaes y a la estructura dentaria, así como también prepara el

conducto radicular para su obturación. El tiempo de contacto con el NaOCl fue de 15 minutos.

Estos autores concluyeron que la irradiación con laser Er,Cr:YSGG redujo la población microbiana en un 96%, es decir, no logró erradicar la totalidad de los microorganismos presentes en los conductos radiculares; mientras que el NaOCl al 3% a los 15 minutos, inhibió completamente el crecimiento de *E. faecalis* y desinfectó todos los conductos radiculares. Ellos atribuyen la desinfección con la irradiación de láser a las puntas de fibra con un diámetro endodóntico de 200µm, la cual mejora la dirección de la luz del láser dentro de los conductos radiculares.<sup>(91)</sup>

Otro tipo de terapia con láser probada en el campo endodóntico es el láser rojo o terapia fotodinámica. Silva *et al*<sup>(92)</sup> evaluaron la acción de este tipo de láser en la reducción de *E. faecalis* en el SCR *in vitro*. La muestra fue dividida en dos grupos, el grupo químico fue irrigado con NaOCl al 0,5% durante 30 minutos, mientras que en el grupo del laser, la pasta fotosensibilizadora se mantuvo en los conductos radiculares por 5 minutos y luego fue irradiado con la luz de láser durante 3 minutos.

Los resultados de este estudio señalan que el fotosensibilizador o el laser por sí mismos no lograron tener efecto bactericida; sin embargo, cuando fueron probados en conjunto, se logró una reducción bacteriana del 99,2% en comparación con la solución química que redujo la población microbiana en un 93,25%. Esta diferencia es estadísticamente significativa, lo que comprueba la efectividad de la terapia con láser como coadyuvante en la terapia endodóntica para la erradicación de *E. faecalis* del SCR.<sup>(92)</sup>

#### **4.2 Control microbiológico con medicación sistémica utilizada como medicación intraconducto**

Los antibióticos no son considerados como parte del procedimiento de rutina en la terapia endodóntica. Además el efecto de los antibióticos sistémicos sobre las bacterias que habitan el SCR, parece ser escaso. Sin embargo, en las infecciones endodónticas, se han combinado el uso de antibióticos con las medicaciones intraconducto como el  $\text{Ca(OH)}_2$  y con los cementos selladores, para aumentar el espectro antimicrobiano de los mismos.

Muestra de ello es el estudio realizado por Hoelscher *et al*<sup>(93)</sup> quienes evaluaron el efecto antimicrobiano de 5 compuestos: la amoxicilina, la penicilina, la clindamicina, el metronidazol y la doxiciclina, mezclados con el cemento sellador Kerr EWT<sup>®</sup> sobre *E. faecalis*. Los resultados señalan que la combinación entre el cemento sellador y la amoxicilina, la penicilina, la clindamicina y la doxiciclina muestran una diferencia significativa en cuanto a zonas de inhibición cuando se compara con el cemento sellador solo. Sin embargo, no hubo diferencias entre el cemento sellador solo y la combinación con metronidazol. Estas diferencias pueden ser producto de la baja sensibilidad de *E. faecalis* al metronidazol, el tipo específico de microorganismo utilizado y su resistencia potencial, o a la poca solubilidad y difusión del metronidazol en el medio de agar.

Por su parte, Molander y Dalhén<sup>(94)</sup> realizaron un estudio donde evaluaron el potencial antibacteriano de la tetraciclina y la eritromicina mezclada con Ca(OH)<sub>2</sub> como medicación intraconducto sobre *E. faecalis in vivo*. El tiempo de contacto con la medicación intraconducto fue de 30 días, y obtuvieron que la mezcla con tetraciclina fue efectiva contra *E. faecalis* en un 79% de los casos (22 de 28); en 7 dientes se pudieron observar otras

especies de microorganismos, por lo que el efecto antibacteriano total fue de un 54%. Con relación a la mezcla con eritromicina, fue efectiva en un 96% de los casos (26 de 27); en 11 dientes se pudieron observar otras especies de microorganismos, por lo que su efecto antibacteriano total fue de 56%. Ellos concluyen que el tratamiento antimicrobiano de  $\text{Ca(OH)}_2$  con eritromicina o tetraciclina tuvo un efecto significativo sobre *E. faecalis*, pero el efecto antimicrobiano total fue poco convincente.

También se han realizado investigaciones donde se evalúa el espectro antimicrobiano de los antibióticos como medicación intraconducto. Así, Pinheiro *et al*<sup>(95)</sup> realizan un estudio donde evalúan la sensibilidad de *E. faecalis* aislados de conductos radiculares con lesiones periapicales, frente a diversos antimicrobianos, entre los cuales se encuentran bencil-penicilina, amoxicilina, ácido clavulánico, eritromicina, azitromicina, vancomicina, cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina, ciprofloxacina y moxifloxacina. Ellos obtuvieron como resultado que cepas aisladas de *E. faecalis* fueron completamente sensibles *in vitro* a la amoxicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, vancomicina y moxifloxacina. Una menor cantidad de estos microorganismos fueron sensibles al cloranfenicol,

tetraciclina, doxiciclina o ciprofloxacina. La eritromicina y la azitromicina fueron los antibióticos menos efectivos.

### III. DISCUSIÓN

La importante participación de los microorganismos en la etiopatogenia de las patologías pulpares y periapicales está claramente establecida desde mediados de los años '60, cuando quedó demostrado por el estudio de Kakehashi *et al*<sup>(39)</sup> que las bacterias y sus productos eran considerados como los agentes etiológicos primarios de la necrosis pulpar y de las lesiones periapicales. Esta premisa ha sido corroborada por numerosas investigaciones desde 1960 hasta nuestros días<sup>(13,14,15,19,40,43,58)</sup>

Gracias al perfeccionamiento y descubrimiento de nuevos métodos moleculares de detección e identificación de la microbiota endodóntica, se han podido evidenciar numerosas especies de microorganismos que actúan de manera importante en el desarrollo de las lesiones perirradiculares. Así lo demuestran Siqueira y Rocas<sup>(14,43,58)</sup> junto a otros investigadores<sup>(13,15,19,41,44,48,50,53)</sup>, quienes analizaron una recopilación de estudios evaluando la microbiota presente en las infecciones endodónticas primarias y persistentes, observando especies de microorganismos como *T. forsythia*, *D. pneumosintes*, *F. alocis* y *E. faecalis* entre otras, nunca antes detectadas a través de cultivos microbiológicos tradicionales.

Un gran número de estudios coinciden en afirmar que *E. faecalis* es el microorganismo mayormente aislado de las infecciones endodónticas persistentes.<sup>(43,49,51-55,58)</sup>

Diversas investigaciones han tratado de establecer y comprobar el mecanismo de resistencia de *E. faecalis* a todo lo concerniente con la terapia endodóntica<sup>(1,2,5,7,8,9,10,24,26,27,28,56)</sup>; a pesar de ello, el mecanismo exacto de supervivencia sigue siendo incierto. Numerosos autores relacionan su capacidad de sobrevivir en medios ambientes áridos con la presencia de factores de virulencia como la sustancia de agregación<sup>(1,2,5,24)</sup> y las proteínas de superficie<sup>(26,27,28)</sup>, entre otros factores presentes en el microorganismo. Así mismo se ha documentado la capacidad de *E. faecalis* de formar biopelículas<sup>(1,5,8,9,10)</sup>, lo cual aumenta su resistencia a los protocolos de irrigación y medicación intraconducto gracias a la unión con otros microorganismos.

Portenier *et al*<sup>(1)</sup> señalan que existen tres hipótesis que pueden explicar la resistencia de estas biopelículas de *E. faecalis* a los medicamentos. La primera hipótesis se refiere a la reducción o baja penetración del medicamento a través de la

misma; la segunda se basa en los posibles cambios en el medio ambiente químico de la biopelícula y la tercera todavía en discusión, pero sugiere que las sub-poblaciones de bacterias dentro de la biopelícula adquieren capacidad fenotípica diferente.

Love<sup>(56)</sup> por su parte, señala que *E. faecalis* posee la habilidad de invadir los túbulos dentinarios y mantenerse viable dentro de ellos y también de adherirse al colágeno presente en la dentina, gracias a la presencia de factores de virulencia que le permiten expresar proteínas para asegurar su supervivencia celular y de competir con otras células bacterianas alterando la respuesta del hospedero y el medio ambiente.

En cuanto a la capacidad de sobrevivir a irrigantes y medicaciones intraconducto, numerosos autores se han dado a la tarea de evaluar en profundidad la acción de dichos medicamentos sobre la virulencia y supervivencia del microorganismo<sup>(60-89)</sup>. *E. faecalis* es el microorganismo más resistente a los efectos antibacterianos del hidróxido de calcio<sup>(72-75)</sup>. Evans *et al*<sup>(76)</sup> señalan que la síntesis de proteínas inducidas por el estrés no participa de manera importante en la supervivencia del microorganismo a altos valores de pH; sin

embargo, el transporte de protones al interior de la célula si cumple una función crítica en la supervivencia frente a estos medios ambientes.

Por el contrario, *E. faecalis* ha demostrado cierta debilidad ante la presencia de medicación intraconducto con clorhexidina<sup>(72-75)</sup>. Yan et al<sup>(81)</sup> señalan que la CH posee la capacidad de sustantividad, la cual se da por la liberación de moléculas cargadas positivamente provenientes de la dentina tratada con CH estas moléculas liberadas se adhieren a la bacteria, interfiriendo así con su adhesión a la dentina y causando daño en la membrana citoplasmática.

Igualmente, numerosas investigaciones apoyan el poder antimicrobiano de irrigantes como el hipoclorito de sodio y la clorhexidina sobre *E. faecalis*<sup>(60,62,63,64,65)</sup>. Estos irrigantes, a diferentes concentraciones y presentaciones, han demostrado ser capaces de erradicar a este microorganismo del interior del SCR, gracias a sus numerosas propiedades antibacterianas.

Mas recientemente, se ha tratado de erradicar a *E. faecalis* del interior del SCR mediante terapias basadas en la irradiación con láser<sup>(90,91,92)</sup>. Aunque todavía es muy pronto para verificar los beneficios de estas terapias con láser, los resultados obtenidos por estos autores<sup>(90,91,92)</sup> han resultado ser satisfactorios no sólo sobre *E. faecalis*, sino sobre otros microorganismos presentes, apuntando hacia una nueva era en la desinfección del SCR.

#### IV. CONCLUSION

1. La microbiota encontrada en dientes con tratamiento de conductos previo y periodontitis apical se caracteriza por una monoinfección (presencia de 1 o tres especies) con predominio de microorganismos Gram positivos, y mayormente especies anaerobias facultativas, siendo el microorganismo más aislado *Enterococcus faecalis*.
2. *Enterococcus faecalis* posee numerosos factores de virulencia, entre los que se encuentran la sustancia de agregación, las proteínas de superficie, el ácido lipoteicoico, la gelatinasa y la hemolisina entre otros, todos ellos importantes y fundamentales para su supervivencia y crecimiento dentro del sistema de conductos radiculares previamente obturado, donde las condiciones ambientales son pobres y la cantidad de oxígeno molecular y nutrientes son escasos o nulos.
3. *Enterococcus faecalis* ha demostrado poseer la capacidad de formar biopelículas entre especies del mismo género o con otros microorganismos, lo que lo hace ser más resistente a los protocolos de limpieza y conformación del

sistema de conductos radiculares durante la terapia endodóntica.

4. Muchos han sido los protocolos de irrigación utilizados para la erradicación de este microorganismo; sin embargo, la combinación entre el irrigante de elección en la terapia endodóntica, el hipoclorito de sodio, y la clorhexidina al 2% han demostrado ser capaces de lograr la erradicación total de *Enterococcus faecalis*.

5. Gracias a su capacidad de penetración dentro de los túbulos dentinarios y de adherirse a las paredes de colágeno de la dentina radicular, *Enterococcus faecalis* es capaz de resistir medicaciones intraconducto con altos valores de pH como el hidróxido de calcio. Sin embargo, al combinar las propiedades antibacterianas del hidróxido de calcio con la sustantividad de la clorhexidina al 2%, las tasas de erradicación del microorganismo son un poco más elevadas.

6. Actualmente se han empleado diversas terapias basadas en el uso de la irradiación con láser dentro del sistema de

conductos radiculares para la eliminación total de *Enterococcus faecalis*. Aunque todavía es muy pronto para verificar los beneficios de éstas, los resultados de los estudios apuntan a una desinfección más completa y segura de los conductos radiculares infectados, no sólo al actuar sobre este microorganismo, sino sobre toda la microbiota presente en ellos.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* –the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. *Endod Topics* 2003; 6: 135-159.
2. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors on *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 308-320.
3. Facklam R, Sahm D, Martins L. *Enterococcus*. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. editores. *Manual of Clinical Microbiology.* 7<sup>th</sup> Edition. American Society for Microbiology. 1999:297-305.
4. Jett B, Huycke M, Gilmore M. Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7: 462-478.
5. Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32: 93-98.
6. McHugh C, Zhang P, Michalek S, Eleazer P. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod.* 2004; 30: 218-9.
7. Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 283-8.
8. George S, Kishen A, Song K. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2005; 31: 867-72.
9. Duggan J, Sedgley C. Biofilm formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2007; 33: 815-18.
10. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia E. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of NaOCl, MTAD and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2007; 33: 852-5.

11. Dunavant T, Regan J, Glickman G, Solomon E, Honeyman A. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod. 2006; 32: 527-31.
12. Lima K, Fava L, Siqueira J. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. J Endod. 2001; 27: 616-9.
13. Baumgartner J. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. Endod Topics. 2004; 7: 35-51.
14. Siqueira J, Rocas I. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 1 – Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. J Endod. 2005; 31: 411-423.
15. Baumgartner J, Hutter J, Siqueira J. Endodontic Microbiology and Treatment of Infections. En: Cohen S., Hargreaves K. editores. Pathways of the Pulp. 9<sup>th</sup> Edition. Mosby Elsevier. 2006:580-607.
16. Fouad A. Primer sensitivity: can it influence the results in *Enterococcus faecalis* prevalence studies?. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006: 1-4.
17. Molander A, Lundquist P, Papapanou P, Dahlén G, Reit C. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from the root canal. Int Endod J. 2002; 35: 1-6.
18. Fouad A, Zerella J, Barry J, Spangberg L. Molecular detection of *Enterococcus faecalis* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99: 112-8.
19. Siqueira J, Rocas I. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004; 97: 85-94.
20. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction and Culture Analyses of *Enterococcus faecalis* in Root Canals. J Endod. 2006; 32: 173-7.

21. Gomes B, Pinheiro E, Sousa E, Jacinto R, Zaia A, Randi C. *et al.* *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 247-53.
22. Williams J, Trope M, Caplan D, Shugars D. Detection and Quantification of *E. faecalis* by Real-time PCR (qPCR), Reverse Transcription-PCR (RT-PCR), and Cultivation During Endodontic Treatment. *J Endod.* 2006; 32: 715-721.
23. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod.* 2006; 32: 104-9.
24. Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation Substance of *Enterococcus faecalis* Mediates Adhesion to Cultured Renal Tubular Cells. *Infect Immun.* 1992; 60: 25-30.
25. Shankar V, Baghdayan A, Huycke M, Lindahl G, Gilmore M. Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infect Immun.* 1999; 67: 193-200.
26. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta M, Cucarella C, Lamata M. *et al.* The Enterococcal Surface Protein, *Esp*, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 4538-4545.
27. Nallapareddy S, Qin X, Weinstock G, Hook M, Murray B. *Enterococcus faecalis* Adhesin, *Ace*, Mediates Attachment to Extracellular Matrix Proteins Collagen Type IV and Laminin as well Collagen Type I. *Infect Immun.* 2000; 68: 5218-5224.
28. Hubble T, Hatton J, Nallapareddy S, Murray B, Gillespie M. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, *Ace*, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 121-126.

29. Ehrenfeld E, Kessler R, Clewell D. Identification of Pheromone-Induced Surface Proteins in *Streptococcus faecalis* and Evidence of a Role for Lipoteichoic Acid in Formation of Mating Aggregates. *J Bacteriol.* 1986; 168: 6-12.
30. Huycke M, Abrams V, Moore D. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 529-536.
31. Hynes W, Walton S. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 183: 201-207.
32. Jett B, Jensen H, Nordquist R, Gilmore M. Contribution of the pAD1-Encoded Cytolysin to the Severity of Experimental *Enterococcus faecalis* Endophthalmitis. *Infect Immun.* 1992; 60: 2445-2452.
33. af Geijersstam A, Culak R, Molenaar L, Chattaway M, Roslie E, Peciuliene V. *et al.* Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 87-94.
34. García C, Seoane R, Aguilera A, Regueiro B. Relación hospedador-bacteria (I). En: Liébana Ureña J. editor. *Microbiología Oral.* 1ra edición. McGraw-Hill. 1997:90-99.
35. Harvey B, Baker C, Edwards M. Contributions of Complement and Immunoglobulin to Neutrophil-Mediated Killing of Enterococci. *Infect Immun.* 1992; 60: 3635-3640.
36. Gaglani M, Baker C, Edwards M. Contribution of Antibody to Neutrophil-Mediated Killing of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Immunol.* 1997; 17: 478-484.
37. Arduino R, Murray B, Rakita R. Roles of Antibodies and Complement in Phagocytic Killing of Enterococci. *Infect Immun.* 1994; 62: 987-993.

38. Vanek N, Simon S, Jacques-Palaz K, Mariscalco M, Dunny G, Rakita R. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. FEMS Immunol Med Microbiol. 1999; 26: 49-60.
39. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med and Oral Pathol. 1965; 18: 340-8.
40. Siqueira J. Endodontic Infections: Concepts, paradigms and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94: 281-93.
41. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. Endod Topics. 2003; 6: 3-28.
42. Pinheiro E, Gomes F, Ferraz C, Sousa E, Teixeira F, Souza-Filho F. Microorganism from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003; 36: 1-11.
43. Siqueira J, Rocas I. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2 – Redefining the Endodontic Microbiota. J Endod. 2005; 31: 488-98.
44. Gomes B, Pinheiro E, Gade-Neto C, Sousa E, Ferraz C, Zaia A. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19: 71-76.
45. Baumgartner J, Falkler W. Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. J Endod. 1991; 17: 380-3.
46. Siqueira J, Rocas I, de Uzeda M, Colombo A. *Actinomyces* Species, Streptococci, and *Enterococcus faecalis* in Primary Root Canal Infections. J Endod. 2002; 28: 168-172.
47. Lana M, Ribeiro-Sobrinho A, Stehling R, Garcia G, Silva B, Hamdan J. et al. Microorganism isolated from root Canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. Oral Microbiol Immunol. 2001; 16: 100-105.

48. Fouad A, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R. et al. PCR-Based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3223-3231.
49. Rocas I, Siqueira J, Santos K. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30: 315-20.
50. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 1-7.
51. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiological analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85: 86-93.
52. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen H, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in Previously Root-Filled Canals in a Lithuanian Population. *J Endod.* 2000; 26: 593-595.
53. Peciuliene V, Reynaud A, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001; 34: 429-434.
54. Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad A. *Enterococcus* Spp. in Endodontically Treated Teeth with and without Periradicular Lesions. *J Endod.* 2005; 31: 851-56.
55. Pinheiro E, Gomes B, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Souza Filho F. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 100-103.
56. Love R. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34: 399-405.

57. Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2001; 91: 579-86.
58. Siqueira J, Rocas I. Polymerase chain reaction – based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97: 85-94.
59. Gomes B, Pinheiro E, Sousa E, Jacinto R, Zaia A, Randi C, de Souza-Filho F. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 247-53.
60. Siqueira J, Machado A, Silveira R, Lopes H., De Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. *Int Endod J.* 1997; 30: 279-282.
61. Abdullah M, Gulabilava K, Moles D, Spratt D. Susceptibilities of Two *Enterococcus faecalis* Phenotypes to Root Canal Medications. *J Endod.* 2005; 31: 30-36.
62. Sena N, Gomes B, Vianna M, Berber V, Zaia A, Ferraz C *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006; 39: 878-885.
63. Vianna M, Gomez B, Bellocchio V, Zaia A, Randi C, de Souza-Filho F. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97: 79-84.
64. Gomes B, Ferraz C, Vianna M, Berber V, Teixeira F, Souza-Filho F. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001; 34: 424-428.

65. Dametto F, Randi C, Figueiredo B, Zaia A, Teixeira F, de Souza-Filho F. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99: 768-72.
66. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-Contaminated Root Canals of Extracted Human Teeth. J Endod. 2003; 29: 576-579.
67. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio R, Kettering J. The antimicrobial effect of MTAD: An *in vitro* investigation. J Endod. 2003; 29: 400-3.
68. Kho P, Baumgartner C. A comparison of the antimicrobial efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2006; 32: 652-655.
69. Krause T, Liewehr F, Hahn C. The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline, and citric acid on *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2007; 33: 28-30.
70. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and Chlorhexidine Digluconate with or without Cetrимide in the presence or absence of dentine powder or BSA. J Endod. 2006; 32: 138-141.
71. Davis J, Maki J, Bahcall J. An *in vitro* comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2007; 33: 567-9.
72. Lin Y, Mickel A, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: Part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2003; 29: 565-6.
73. Schafer E, Bossman K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2005; 31: 53-6.

74. Basrani B, Tjaderhane L, Santos M, Pascon E, Grad H, Lawrence H. *et al.* Efficacy of chlorhexidine –and calcium hydroxide- containing medicaments against *Enterococcus faecalis in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 96: 618-24.
75. Gomes B, Souza S, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Valdrighi L. *et al.* Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. Int Endod J. 2003; 36: 267-75.
76. Evans M, Davies J, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J. 2002; 35: 221-228.
77. Cwikla S, Belanger M, Giguere S. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. J Endod. 2005; 31: 50-2.
78. Lynne R, Liewehr F, West L, Patton W, Buxton T, McPerson J. *In vitro* antimicrobial activity of various medication preparations on *Enterococcus faecalis* in root canal dentin. J Endod. 2003; 29: 187-90.
79. Siqueira J, Guimaraes-Pinto T, Rocas I. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% NaOCl and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. J Endod. 2007; 33: 800-5.
80. Siqueira J, Paiva S, Rocas I. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. J Endod. 2007; 33: 541-7.
81. Yan S, Cha J, Kim E, Kum K, Lee C, Jung I. Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of *Enterococcus faecalis* to bovine dentin. J Endod. 2006; 32: 663-7.
82. Paquette L, Legner M, Fillery E, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication *in vivo*. J Endod. 2007; 33: 788-95.

83. Chang, Y, Tai, K, Chou, L, Chou, M. Effects of Camphorated Parachlorophenol on Human Periodontal Ligament Cells *In Vitro*. J Endod. 1999; 25: 745-8.
84. Sukawat C., Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2002; 28: 102-4.
85. Siqueira J, Magalhaes K, Rocas I. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. J Endod. 2007; 33: 667-72.
86. Lui J, Sae-Lim V, Song K, Chen N. *In vitro* antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated gutta percha points on *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2004; 37: 105-113.
87. Dartan M, Kiyan M, Gerceker D. Antimicrobial effect *in vitro* of gutta percha points containing root canal medications against yeast and *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102: 410-2.
88. Mickel A, Nguyen T, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2003; 29: 257-8.
89. Saleh I, Ruyter I, Haapasalo M, Orstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. Int Endod J. 2004; 37: 193-198.
90. George S, Kishen A. Advanced noninvasive light-activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast vs. antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2007; 33: 599-602.
91. Eldeniz A, Hadimli H, Erganis O. Bactericidal efficacy of Er,Cr:YSGG laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with NaOCl irrigation: an *ex vivo* pilot study. Int Endod J. 2007; 40: 112-119.

92. Silva A, Núñez S, Lage-Marques J, Cardoso A, Simoes M. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102: e93-e98.
93. Hoelscher A, Bahcall J, Maki J. In vitro evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer-antibiotic combination against *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2006; 32: 145-7.
94. Molander A, Dalhén G. Evaluation of the antibacterial potential of tetracycline and erythromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis in vivo*. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Oral Endod. 2003; 96: 744-50.
95. Pinheiro E, Gomes B, Drucker D, Zaia A, Ferraz C, Souza-Filho F. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from root canals of root filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2004; 37: 756-763.