



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL LÁSER ROJO USANDO DIFERENTES
FOTOSENSIBILIZADORES EN PREMOLARES HUMANOS MONORRADICULARES
CONTAMINADOS CON *Enterococcus faecalis* ATCC 29212**

Línea de Investigación: Biomateriales

Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Torres Párraga, Franz Luis

ASESOR

Esp. Mallma Medina, Adrián

JURADO

Dr. Portal Bustamante, Neme

Dr. Quiñones Lozano, José Duarte

Mg. Chuna Espinoza, Jorge Dante

LIMA – PERÚ

2020

AGRADECIMIENTO

A Dios por guiarme y acompañarme en mi camino.

A mis padres Francisco Torres y Lucina Párraga por apoyarme siempre y motivarme a nunca
darme por vencido.

A mis hermanos Angel y Jafet por siempre sacarme una sonrisa aun en los momentos difíciles

A mis asesores y jurados por orientarme y permitir realizar este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, hermanos y maestros por apoyarme siempre para cumplir mis metas.

Índice

Resumen

Abstract

I.	Introducción	1
	1.1 Descripción y formulación del problema	2
	1.2 Antecedentes	4
	1.3 Objetivos	6
	– Objetivo General	6
	– Objetivos Específicos	6
	1.4 Justificación	7
	1.5 Hipótesis	8
II.	Marco Teórico	9
	2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación	9
III.	Método	23
	3.1 Tipo de investigación	23
	3.2 Ámbito temporal y espacial	23
	3.3 Variables	23
	3.4 Población y muestra	24
	3.5 Instrumentos	25
	3.6 Procedimientos	26
	3.7 Análisis de datos	32
	3.8 Consideraciones éticas	33
IV.	Resultados	34

V.	Discusión de resultados	41
VI.	Conclusiones	45
VII.	Recomendaciones	46
VIII.	Referencias	47
IX.	Anexos	53
	Anexo 1. Ficha de recolección de datos	53
	Anexo 2. Carta de presentación dirigida al Hospital Nacional Hipólito Unanue	54
	Anexo 3. Carta de aprobación del proyecto de tesis del Hospital Nacional Hipólito Unanue	55
	Anexo 4. Carta de presentación dirigida a la Clínica de Endodoncia	56
	Anexo 5. Ficha técnica del Equipo Láser Therapy XT (DMC)	57
	Anexo 6. Ficha técnica del Fotosensibilizador Azul de Metileno Chimiolux 5 (DMC)	58
	Anexo 7. Ficha técnica del Verde de Malaquita	59
	Anexo 8. Consentimiento informado	60
	Anexo 9. Lista de imágenes	61
	Anexo 10. Matriz de consistencia	72

Resumen

Objetivo: Evaluar el efecto antibacteriano del láser rojo usando diferentes fotosensibilizadores como el azul de metileno y el verde de malaquita en premolares humanos monorradiculares contaminados con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Método:** Diseño experimental, prospectivo, transversal y comparativo. El presente estudio evaluó 30 premolares que cumplieron con los criterios de selección. **Procedimiento:** Se seccionaron las coronas de los premolares para estandarizar su longitud a 15 mm, luego se prepararon los conductos radiculares con el sistema rotatorio Protaper Next hasta 1 mm antes del foramen apical. Se procedió a la contaminación de los conductos radiculares con cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 durante 21 días. **Grupo LS+AM:** Irradiación del láser rojo asociado al azul de metileno, **Grupo LS+VM:** Irradiación del láser rojo asociado al verde de malaquita y **Grupo control:** Sin tratamiento. El recuento bacteriano se determinó mediante Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml). **Resultados:** Se encontraron recuentos de UFC/ml de *Enterococcus faecalis* significativamente menores en los grupos AM+LS y VM+LS en comparación con el grupo control ($p < 0.001$). Asimismo, el grupo AM+LS mostró un recuento de UFC/ml de *Enterococcus faecalis* significativamente menor en comparación con el grupo VM+LS ($p < 0.001$). **Conclusiones:** El láser rojo asociado tanto al azul de metileno como al verde de malaquita presentó un efecto antibacteriano significativo en ambos casos, siendo la asociación con el azul de metileno el que presentó un mejor efecto antibacteriano frente al *Enterococcus faecalis*. **Palabras clave:** Azul de metileno, verde de malaquita, láser rojo, *Enterococcus faecalis*.

Abstract

Objective: To evaluate the antibacterial effect of the red laser using different photosensitizers such as methylene blue and malachite green in single-rooted human premolars contaminated with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Method:** Experimental, prospective, cross-sectional and comparative design. The present study evaluated 30 premolars that met the selection criteria. **Procedure:** The crowns of the premolars were sectioned to standardize their length to 15 mm, then the root canals were prepared with the Protaper Next rotary system up to 1 mm before the apical foramen. The root canals were contaminated with strains of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 for 21 days. **Group LS+AM:** Irradiation of the red laser associated with methylene blue, **Group LS+VM:** Irradiation of the red laser associated with malachite green and **Control group:** No treatment. The bacterial count was determined by Colony Forming Units per ml (CFU/ml). **Results:** Significantly lower *Enterococcus faecalis* CFU/ml counts were found in the AM+LS and VM+LS groups compared to the control group ($p < 0.001$). Likewise, the AM+LS group showed a significantly lower *Enterococcus faecalis* CFU/ml count compared to the VM+LS group ($p < 0.001$). **Conclusions:** The red laser associated with both methylene blue and malachite green presented a significant antibacterial effect in both cases, being the association with methylene blue the one that presented a better antibacterial effect against *Enterococcus faecalis*. **Keywords:** Methylene blue, malachite green, red laser, *Enterococcus faecalis*.

I. Introducción

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto antibacteriano del láser rojo usando diferentes fotosensibilizadores como el azul de metileno y el verde de malaquita frente al *Enterococcus faecalis*, que es una de las especies bacterianas más frecuentes en los casos de reinfecciones endodónticas, esto gracias a su capacidad de sobrevivir en condiciones muy desfavorables dentro del sistema de conductos radiculares y a la formación de biofilm.

Se realizó este estudio, debido a que en la actualidad las técnicas endodónticas convencionales (químico-mecánicas) no han podido lograr la eliminación completa de los microorganismos presentes en los conductos radiculares, siendo el *Enterococcus faecalis* el que más resistencia a presentado al tratamiento.

La desinfección del sistema de conductos radiculares es uno de los objetivos principales en la endodoncia, y al realizarse de manera inadecuada o incompleta va a resultar en el fracaso del tratamiento endodóntico. Por ello, es fundamental la búsqueda de nuevos métodos alternativos y/o complementarios al tratamiento endodóntico convencional, con el fin de disminuir las fallas endodónticas.

Se ha introducido a la terapia fotodinámica en el campo de la endodoncia, dado que este procedimiento es capaz de destruir a los microorganismos resistentes, combinando la acción de una fuente de luz con una longitud de onda específica (roja, azul, verde, entre otras) y un fotosensibilizador compatible.

La asociación del láser rojo y de un fotosensibilizador como el azul de metileno ha obtenido buenos resultados frente a los microorganismos resistentes por la compatibilidad que existe entre ambos, sin embargo, se ha estudiado muy poco al verde de malaquita, a pesar de que este fotosensibilizador no solo es compatible con longitudes de onda rojas, sino que, además puede

ser activado por otras longitudes de onda como la azul y la verde, lo cual le da una ventaja sobre otros fotosensibilizadores, en cuanto a su aplicación. De manera práctica, el presente trabajo busca utilizar al verde de malaquita como un fotosensibilizador alternativo al azul de metileno ya que, puede ser activado por diferentes longitudes de onda, demostrando ser más versátil en su aplicación que otros fotosensibilizadores. El hecho de conocer el efecto de diferentes fotosensibilizadores activados por fuentes de luz compatibles, nos facilitará la elección del fotosensibilizador idóneo frente a microorganismos resistentes como el *Enterococcus faecalis*.

Para el desarrollo de esta investigación, se utilizaron referencias actualizadas de los últimos 5 años, que permitieron sustentar los procedimientos para obtener resultados y a su vez alcanzar los objetivos planteados y de ese modo, responder a la interrogante que motivó el estudio.

La presente investigación fue de tipo experimental, prospectivo, transversal y comparativo, con lo cual se pudo conseguir objetivos concretos.

1.1 Descripción y formulación del problema

La desinfección es uno de los objetivos primordiales en la endodoncia, ya que la eliminación de los microorganismos del sistema de conductos radiculares va a determinar el éxito o fracaso del tratamiento endodóntico (Arnabat, 2015).

En el transcurso de los años, se han empleado una gran variedad de técnicas y materiales para lograr la desinfección ideal, siendo la preparación químico-mecánica la más utilizada por los endodoncistas (Cohen, Hargreaves y Berman, 2011).

Sin embargo, debido a la resistencia de los microorganismos presentes en los conductos radiculares, resulta muy difícil lograr su eliminación completa con las técnicas endodónticas convencionales (Núñez, Ribeiro y Garcez, 2013).

Uno de los microorganismos que más resistencia ha presentado al tratamiento endodóntico es el *Enterococcus faecalis* que, debido a su capacidad de sobrevivir en condiciones muy desfavorables dentro del sistema de conductos radiculares y a la formación de biofilm, se ha convertido en la especie bacteriana más frecuente en los casos de reinfecciones endodónticas (Cohen *et al.*, 2011).

Por esta razón, es fundamental la búsqueda de nuevos métodos alternativos y/o complementarios al tratamiento endodóntico convencional, a fin de disminuir las fallas endodónticas.

Actualmente, la terapia fotodinámica se ha introducido en el campo de la endodoncia, éste procedimiento es capaz de destruir a los microorganismos resistentes, combinando la acción de una fuente de luz con una longitud de onda específica y un fotosensibilizador en presencia de oxígeno (Núñez *et al.*, 2013).

Se han realizado muchas investigaciones sobre las diferentes fuentes de luz, siendo los láseres de diodo de baja potencia los más empleados en la terapia fotodinámica. Asimismo, uno de los fotosensibilizadores más estudiados es el azul de metileno, el cual puede ser activado por una fuente de luz a una longitud de onda que va desde 610 a 660 nm (luz roja) (Núñez *et al.*, 2013).

Últimamente, se ha estudiado el efecto antibacteriano de la terapia fotodinámica usando láseres con una longitud de onda roja (660 nm) como fuentes de luz, asociados a azul de metileno como fotosensibilizador frente a los microorganismos presentes en los conductos radiculares, obteniéndose buenos resultados gracias a la buena afinidad entre ambos (López *et al.*, 2015).

Otro fotosensibilizador revisado en la literatura es el verde de malaquita, el cual puede ser activado por una fuente de luz a una longitud de onda que va desde 350 a 450 nm (luz ultravioleta y azul) y otra que va desde 550 a 650 nm (luz verde a roja) (Núñez *et al.*, 2013).

Esta característica le permite al verde de malaquita ser más versátil comparado con otros fotosensibilizadores, en cuanto a su aplicación, ya que puede ser activado por fuentes de luz con diferentes longitudes de onda, además de la luz roja. De esta manera, es probable que, al tener una buena absorción a la misma fuente de luz roja, el verde de malaquita presente un efecto antibacteriano similar o mayor al azul de metileno. Por tal motivo, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto antibacteriano del láser rojo usando diferentes fotosensibilizadores como el azul de metileno y el verde de malaquita, en premolares humanos monorradiculares contaminados con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

De acuerdo a las consideraciones mencionadas, se formula la siguiente interrogante:

¿Cuál es el efecto antibacteriano del láser rojo usando diferentes fotosensibilizadores como el azul de metileno y el verde de malaquita en premolares humanos monorradiculares contaminados con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212?

1.2 Antecedentes

Sebrão, Bezerra, de França, Ferreira & Westphalen (2017) en Brasil, realizaron una investigación donde se comparó la eficacia de una técnica de terapia fotodinámica (PDT) que emplea rosa de bengala (RB) y azul de metileno (MB) como fotosensibilizadores (PS) para reducir la viabilidad de *Enterococcus faecalis*. Se usó MB al 0.01% (31.2 $\mu\text{mol/L}$) en asociación con un láser rojo (660 nm) como fuente de luz en el grupo de MB (MBG). Alternativamente, la misma prueba se realizó con RB (25 $\mu\text{mol/L}$) que se asoció con un láser verde (532 nm) como fuente de luz en el grupo RB (RBG). Se usó una solución salina (0.9%) para el grupo de control.

Las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) se calcularon luego de 24 horas de incubación a 37 ° C. Para el análisis estadístico se usó la prueba de ANOVA. Se halló una reducción significativa en la UFC/ml en el grupo RBG (0.12×10^8) en comparación con el control (2.82×10^8) y los grupos MBG (2.66×10^8). Se concluye que la PDT puede mejorarse si se usa RB en asociación con una fuente de láser de luz verde para la inactivación de *E. faecalis*.

Silva *et al.* (2014) en Brasil, evaluaron los efectos de la terapia fotodinámica (PDT) sobre la viabilidad de *Enterococcus faecalis* utilizando azul de metileno (MB) y verde de malaquita (MG) como fotosensibilizadores. Se prepararon soluciones que contenían *E. faecalis* ATCC 29212 y se recolectaron mediante centrifugación para obtener suspensiones celulares, que se mezclaron con MB al 0.1% y MG al 0.1%. Las muestras se irradiaron individualmente utilizando un láser de diodo (con una longitud de onda de 660 nm) y a una distancia de 1 mm durante 30, 60 o 120 segundos. Las unidades de formación de colonias (UFC) se determinaron para cada tratamiento. Se realizó el análisis estadístico mediante las pruebas de ANOVA y Tukey. Se encontró que La PDT durante 60 y 120 segundos con MG redujo significativamente la viabilidad de *E. faecalis*. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó MB como fotosensibilizador. Se concluye que la PDT que usa MB y MG tiene un efecto antibacteriano contra *E. faecalis*, lo que demuestra el potencial para ser utilizado como un procedimiento antimicrobiano adyuvante en la terapia endodóntica.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antibacteriano del láser rojo usando diferentes fotosensibilizadores como el azul de metileno y el verde de malaquita en premolares humanos monorradiculares contaminados con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.- Determinar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005% en premolares monorradiculares humanos.

2.- Determinar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005% en premolares monorradiculares humanos.

3.- Determinar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 sin irradiación del láser rojo asociado a un fotosensibilizador en premolares monorradiculares humanos.

4.- Comparar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005% y con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005% en premolares monorradiculares humanos.

5.- Comparar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005% y sin irradiación del láser rojo asociado a un fotosensibilizador en premolares monorradiculares humanos.

6.- Comparar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005% y sin irradiación del láser rojo asociado a un fotosensibilizador en premolares monorradiculares humanos.

7.- Comparar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%, con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005% y sin irradiación del láser rojo asociado a un fotosensibilizador en premolares monorradiculares humanos.

1.4 Justificación

El presente trabajo, busca aumentar evidencia sobre el efecto antibacteriano que posee el láser rojo asociado a diferentes fotosensibilizadores como el azul de metileno y el verde de malaquita frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, debido a que la asociación entre ambos ha demostrado buenos resultados frente a microorganismos resistentes. Se han realizado estudios sobre la aplicación del láser con longitud de onda rojas asociados al azul de metileno por la compatibilidad que existe entre ambos. Sin embargo, se ha estudiado muy poco al verde de malaquita, a pesar de que este fotosensibilizador no solo presenta afinidad con longitudes de onda rojas, sino que, además puede ser activado por otras longitudes de onda como la azul y la verde, lo que le da una ventaja respecto a otros fotosensibilizadores, en cuanto a su aplicación.

En la práctica, busca utilizar al verde de malaquita como un fotosensibilizador alternativo al azul de metileno ya que, puede ser activado por diferentes longitudes de onda, demostrando ser más versátil en su aplicación que otros fotosensibilizadores. El hecho de conocer el efecto de diferentes fotosensibilizadores activados por fuentes de luz compatibles, nos facilitará la elección

del fotosensibilizador idóneo frente a microorganismos resistentes como el *Enterococcus faecalis*.

1.5 Hipótesis

Es probable que se encuentren diferencias en el efecto antibacteriano del láser rojo usando el fotosensibilizador azul de metileno y el fotosensibilizador verde de malaquita en premolares contaminados con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

II. Marco Teórico

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

La desinfección es uno de los objetivos primordiales en la endodoncia, ya que la eliminación de los microorganismos del sistema de conductos radiculares va a definir el éxito o fracaso del tratamiento endodóntico. Para lograrlo se han utilizado conjuntamente las diversas técnicas endodónticas de irrigación (soluciones irrigadoras), instrumentación (instrumentos manuales y rotatorios) y medicación intraconducto (antisépticos y antibióticos) (Arnabat, 2015).

Sin embargo, debido a la resistencia de los microorganismos presentes en los conductos radiculares, resulta muy difícil lograr su eliminación completa con las técnicas endodónticas convencionales (Núñez *et al.*, 2013).

Las infecciones intrarradiculares persistentes o secundarias son las principales causas del fracaso del tratamiento endodóntico, puesto que se ha demostrado que hay un alto riesgo de contaminación bacteriana durante la obturación de los conductos radiculares. Además, la mayoría de los conductos tratados endodónticamente (si no todos) que muestran indicios de lesiones persistentes de periodontitis apical albergan infecciones intrarradiculares (Cohen *et al.*, 2011).

Las infecciones persistentes son causadas por microorganismos de una infección primaria que resistieron el tratamiento antimicrobiano intraconducto y soportaron períodos de escasez de nutrientes en un conducto preparado. Asimismo, son causadas por microorganismos que no se encontraban en la infección primaria, pero que se introdujeron en el sistema de conductos radiculares en algún momento durante o después del tratamiento (Torabinejad, Walton & Fouad, 2015).

Liébana (2002) afirma: “La vía de acceso que utilice la microbiota para infectar a la pulpa de dientes vitales determina la composición microbiana de la infección” (p.600).

Si la comunicación de la pulpa con la cavidad oral se origina a través de una lesión cariosa amplia o de un traumatismo, se ha encontrado que las bacterias más prevalentes son *estreptococos viridans*, *Lactobacillus* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus parainfluenzae*, *Corynebacterium* spp. y *S. epidermidis*. Mientras que, si la necrosis de la pulpa avanza apicalmente, las bacterias anaerobias estrictas serán las que predominen, como los cocos grampositivos y bacilos gramnegativos. Por otra parte, si el acceso de las bacterias a la pulpa dental, se produce a través de los túbulos dentinarios, serán las bacterias cariogénicas las que predominen, como el *estreptococo viridans*, *Lactobacillus* spp. y *Actinomyces* spp., aunque también se han aislado *Propionibacterium* spp. y algunas bacterias gramnegativas anaerobias estrictas. Asimismo, si las bacterias acceden a la pulpa dental a través de una bolsa periodontal se ha encontrado que las bacterias más prevalentes son bacterias grampositivas, entre ellas *Peptostreptococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Propionibacterium* spp. Aunque también se han aislado bacilos gramnegativos como algunas especies de *Porphyromonas* y de *Campylobacter* (Liébana, 2002).

La composición de la microbiota del conducto radicular depende de variables ecológicas como: la tensión de oxígeno, el tipo y cantidad de nutrientes disponibles, temperatura, pH, capacidad de adhesión a las superficies y las interacciones bacterianas. Asimismo, la mayoría de la microbiota infectante se encuentra en el conducto principal, debido a que esa región se encuentra la mayor cantidad de nutrientes del sistema de conductos radiculares. Las principales fuentes de nutrientes de las bacterias que habitan el sistema de conductos radiculares son: la pulpa necrótica, las proteínas y glucoproteínas de los líquidos tisulares, el exudado inflamatorio,

los componentes de la saliva y los productos del metabolismo de otras bacterias (Cohen *et al.*, 2011).

Los estudios han demostrado visiblemente que, las bacterias grampositivas facultativas o anaerobias (estreptococos, lactobacilos, Actinomyces, Propionibacterium, *Enterococcus faecalis*, *Olsenella uli*, *Parvimonas micra* y *Pseudoramibacter alactolyticus*) son las que más se resisten al tratamiento antimicrobiano, debido a su capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales más hostiles en los conductos radiculares instrumentados y medicados (Cohen *et al.*, 2011).

Enterococcus es un género bacteriano que forma parte de la microbiota normal de la cavidad oral y el tracto gastrointestinal. Dentro de este género, se encuentra el *Enterococcus faecalis*, un coco grampositivo anaerobio facultativo, cuyo crecimiento óptimo es a 37°C y que es considerada la especie más infecciosa del género (Portenier, Waltimo & Haapasalo, 2003).

Muchos estudios han demostrado la participación de esta especie bacteriana en infecciones de la cavidad oral, principalmente en las infecciones persistentes y secundarias de los conductos radiculares (Cohen *et al.*, 2011).

Torabinejad *et al.* (2015) refieren que el *Enterococcus faecalis* es una especie bacteriana que ha sido hallada frecuentemente en los conductos radiculares de dientes tratados endodónticamente, con una prevalencia del 30% al 90% de los casos.

Esto, debido a su resistencia a los medicamentos antimicrobianos empleados en el tratamiento endodóntico convencional, como el hidróxido de calcio, el paramonoclorofenol alcanforado, la clorhexidina y el hipoclorito de sodio, y a su capacidad de sobrevivir en condiciones muy hostiles en los conductos radiculares y la región apical (Torabinejad *et al.*, 2015).

Las bacterias que persisten en el conducto radicular después del tratamiento químico - mecánico y la medicación intraconducto no siempre producirán un proceso infeccioso, ya que

existen evidencias donde las lesiones de peridontitis cicatrizaron incluso después de que las bacterias se encontraron en el conducto radicular durante la obturación. Este comportamiento se debe a que las bacterias pueden morir por la toxicidad de los materiales de obturación, la inaccesibilidad a los nutrientes, la alteración de la ecología bacteriana, una virulencia baja o incluso una localización que no les permitan el acceso a los tejidos perirradiculares. Sin embargo, si las bacterias resisten las condiciones mencionadas, además de la resistencia del huésped, pueden influir en el resultado del tratamiento endodóntico (Cohen *et al.*, 2011).

Varios estudios de cultivos y biología molecular han demostrado que el *Enterococcus faecalis* es una especie bacteriana frecuentemente encontrada en los conductos radiculares de dientes tratados endodónticamente, hasta en el 90% de los casos. Esto, debido a su resistencia a los medicamentos intraconductos, su capacidad de formar biofilm, penetrar los túbulos dentinarios y resistir largos períodos de privación de nutrientes (Torabinejad *et al.*, 2015).

Se ha propuesto que la resistencia del *Enterococcus faecalis* al tratamiento endodóntico convencional, ya sea con instrumentación, irrigación y/o medicación intraconducto, se debe a que puede agruparse en forma de biofilm (Sena *et al.*, 2006).

El biofilm es una estructura que asocia a una o varias especies bacterianas, embebidas en una matriz de polisacáridos autoproducida y que se encuentra adherida a una superficie (principalmente tejidos necróticos) o sustrato (Costerton, Stewart & Greenberg, 1999).

Esta matriz de polisacáridos funciona como una barrera física y química que evita la entrada de los agentes antibacterianos dentro del conducto radicular, causando el fracaso de tratamientos de conductos aparentemente correctos (Ricucci, Siqueira, Bate & PittFord, 2009).

Todas estas propiedades en conjunto explicarían la prevalencia significativamente elevada de *Enterococcus faecalis* en los conductos radiculares que fueron tratados endodónticamente (Cohen *et al.*, 2011).

Por esta razón, es fundamental la búsqueda de nuevos métodos alternativos y/o complementarios al tratamiento endodóntico convencional, a fin de disminuir las fallas endodónticas y optimizar la desinfección del conducto radicular (Núñez *et al.*, 2013).

La terapia fotodinámica aparece como una alternativa y/o complemento al tratamiento endodóntico, ya que se ha investigado en la literatura, que sus efectos no producen resistencia en los microorganismos y que además pueden eliminar microorganismos organizados en biofilm (Wilson, 2004).

Asimismo, se ha usado la terapia fotodinámica en otras áreas de la Odontología como: periodoncia, odontología restauradora, odontopediatría y diagnóstico de lesiones malignas de la mucosa oral, obteniéndose buenos resultados (Núñez *et al.*, 2013).

La fotomedicina es una rama de la medicina que utiliza la luz para el tratamiento de las enfermedades. Estos tratamientos pueden ser: la fototerapia, la fotoquimioterapia y la terapia fotodinámica (Regan & Parrish, 1982).

La terapia fotodinámica o PDT, acrónimo de photodynamic therapy es un tratamiento que utiliza la acción combinada de la irradiación con una luz visible y un fotosensibilizador para la destrucción de tejidos u organismos patógenos (Núñez *et al.*, 2013).

Dougherty (1987) refiere que una de las primeras aplicaciones que tuvo la terapia fotodinámica fue para el tratamiento de los tumores, ya que en una de sus investigaciones demostró que la aplicación de un derivado de la hematoporfirina seguida de la irradiación con un láser de corriente produjo la destrucción de células tumorales.

Debido a ello, la FDA (Foods and Drugs Administration, EUA) permitió la aplicación de la terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer (de cabeza) en 1993 (Núñez *et al.*, 2013).

El uso de la terapia fotodinámica como terapia antimicrobiana fue descubierta por Oscar Raab, quien fue el primero en visualizar los efectos fototóxicos del clorhidrato de acridina y luz visible en *Paramecium caudatum* en 1900 (Soukos & Goodson, 2011).

La aparición de los antibióticos en 1928, trajo consigo que se disminuyeran las investigaciones sobre la capacidad antimicrobiana de la terapia fotodinámica (Santezi, Reina & Dovigo, 2018).

Sin embargo, al demostrarse la resistencia bacteriana que presentaban los microorganismos a los antibióticos, las investigaciones de la terapia fotodinámica para el tratamiento de las infecciones se reanudaron. Esto, debido a que los microorganismos no presentan resistencia a los efectos citotóxicos de la terapia fotodinámica (Wainwright, 1998).

El mecanismo de acción de la PDT se produce mediante la activación de un fotosensibilizador (no tóxico) por una luz visible de una longitud de onda específica y en presencia de oxígeno, para la creación de especies reactivas de oxígeno (oxígeno singlete y radicales libres), que generan la destrucción de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otros componentes de las células microbianas (Konopka & Goslinski, 2007).

La producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se produce mediante dos tipos de reacciones. Por un lado, la reacción tipo I provoca la formación de radicales libres por transferencia de oxígeno o electrones, y puede causar daño celular directo. Mientras que la reacción tipo II libera un estado de oxígeno excitado electrónicamente y altamente reactivo, denominado oxígeno singlete, y se reconoce como la vía principal en la destrucción de células microbianas. Aunque es difícil distinguir entre los dos mecanismos de reacción, el daño celular

depende tanto de la tensión de oxígeno como de la concentración de la sustancia fotosensibilizadora (Konopka & Goslinski, 2007).

Los fotosensibilizadores (PS) son colorantes o tintes que, al ser activados por una fuente de luz a una determinada longitud de onda, pueden producir efectos terapéuticos sobre los tejidos biológicos y efectos fototóxicos sobre los microorganismos. Esto, depende principalmente de que el fotosensibilizador tenga una buena afinidad con la célula-objetivo para ser absorbido y no sea tóxico para las células normales (Wainwright, Phoenix, Marland, Wareing & Bolton, 1997).

Otro elemento a considerar de los fotosensibilizadores es su concentración, que puede ser expresada en moles (M) o porcentajes (%), ya que el número de este puede afectar el resultado de la terapia fotodinámica. El uso de altas concentraciones de fotosensibilizador puede formar agregados que alteran la absorción de la fuente de luz. Asimismo, el empleo de algunas concentraciones de fotosensibilizador puede ocasionar manchas en los dientes, después de la aplicación de la terapia fotodinámica, ya sea en tratamientos de endodoncia, periodoncia, odontopediatría, etc (Núñez *et al.*, 2013).

Costa *et al.* (2016) refieren que el uso de fotosensibilizadores (como el azul de metileno, azul de toluidina y verde de malaquita) en concentraciones de 0.01% produjeron cambios de coloración en piezas dentarias, luego de 60 días de haberse realizado terapia fotodinámica como parte de un tratamiento endodóntico.

Por ello, es indispensable conocer la concentración correcta del fotosensibilizador. Aunque no hay un consenso respecto a cuál es la mejor concentración, se han reportado concentraciones que van de 10 μ M a 2 mM (Núñez *et al.*, 2013).

La terapia fotodinámica utiliza diferentes fotosensibilizadores para el tratamiento del cáncer y fines antimicrobianos. Las porfirinas, clorinas, ftalocianinas y bacterioclorinas están indicadas

para el tratamiento del cáncer, debido a su ubicación tumoral y baja toxicidad en ausencia de luz en las células de los mamíferos (Wainwright, 1998).

Mientras que los fotosensibilizadores más estudiados para fines antimicrobianos pertenecen a los grupos xantenos halogenados, fenotiazinas, acridinas y clorinas conjugadas, debido a su capacidad de unirse a la membrana celular de las células bacterianas (Hamblin & Hasan, 2004).

Los principales fotosensibilizadores utilizados para la terapia fotodinámica antimicrobiana son: Azul de metileno:

Es un fotosensibilizador perteneciente al grupo de las fenotiazinas que puede ser activado por una fuente de luz a una longitud de onda que va desde los 610 a 660 nm (luz roja) (Núñez *et al.*, 2013).

El azul de metileno puede penetrar tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas, gracias a su hidrofilia, bajo peso molecular y carga positiva. Estas características le permiten al azul de metileno, pasar a través de los canales de proteína porina para unirse a la membrana bacteriana externa de las bacterias gramnegativas (Soukos & Goodson, 2011).

El azul de metileno ha sido empleado como antiséptico tópico por sus propiedades antibacterianas, así como también para detectar lesiones premalignas de la mucosa y como tinte marcador en cirugía. Además, el azul de metileno actualmente es usado para el tratamiento de la metahemoglobinemia (Soukos & Goodson, 2011).

Es uno de los fotosensibilizadores más utilizados para la terapia fotodinámica junto al azul de toluidina y puede ser utilizada en varias concentraciones (Nagata *et al.*, 2012).

Guinzelli, Souza, Cecchin, Farina & De figuereido (2014) refieren que el azul de metileno puede ser utilizado como fotosensibilizador en una concentración del 0.01% para la terapia fotodinámica.

López *et al.* (2015) refieren que el azul de metileno también puede ser utilizado en una concentración del 0.005% para la aplicación de la terapia fotodinámica.

Azul de toluidina:

Es un fotosensibilizador que pertenece al grupo de las fenotiazinas y puede ser activado por una fuente de luz a una longitud de onda que va desde los 590 a 630 nm (luz naranja y roja) (Núñez *et al.*, 2013).

Asimismo, azul de toluidina puede ser utilizado como fotosensibilizador en una concentración del 0.01% para la terapia fotodinámica (López *et al.*, 2015).

Verde de malaquita:

Es otro fotosensibilizador que también es utilizado para la terapia fotodinámica y puede ser activado por una fuente de luz a una longitud de onda que va desde 350 a 450 nm (luz ultravioleta a azul) y otra que va desde 550 a 650 nm (luz verde a roja) (Núñez *et al.*, 2013).

El verde de malaquita muestra una gran absorción en el extremo rojo del espectro visible y transita fácilmente través de la membrana celular en especies bacterianas Gram positivas y Gram negativas, ya que posee una carga positiva al igual que el azul de metileno. (Prates *et al.*, 2007).

Pertenece a la familia del triarilmetano (que también incluye Crystal Violet y Victoria Blue), podría emplearse como un fotosensibilizador viable dado que promueve la disipación del potencial de la membrana celular (Kowaltowsky, Turin, Indig & Vercesi, 1999).

Se ha utilizado al verde de malaquita al 0.1% como detector de placa bacteriana en periodoncia (Kocher, Langenbeck, Ruhling & Plangmann, 2000).

Silva *et al.* (2014) refieren que el verde de malaquita, como fotosensibilizador, puede ser utilizado en una concentración de 0.1% para su uso en la terapia fotodinámica.

Souza *et al.* (2010) sugieren que el verde de malaquita también puede ser utilizado en una concentración del 0.01% para la terapia fotodinámica.

Rosa de bengala:

Es un fotosensibilizador que puede ser activado por una fuente de luz a una longitud de onda que va desde los 480 a 600 nm (luz azul a roja) (Núñez *et al.*, 2013).

Sebrão *et al.* (2017) refieren que este fotosensibilizador puede ser utilizado en una concentración de 25 $\mu\text{mol/L}$ para su aplicación en la terapia fotodinámica.

Curcumina:

Es un fotosensibilizador que puede ser activado por una fuente de luz a una longitud de onda de 450 nm (luz azul). Además, puede ser utilizado en una concentración de 20 $\mu\text{mol/L}$ (Da Frota *et al.*, 2015).

El tiempo de pre-irradiación se refiere al tiempo que transcurre entre la aplicación del fotosensibilizador en el objetivo y su activación por la luz. Este tiempo resulta ser un punto crucial para el éxito de la terapia fotodinámica, puesto que, si el fotosensibilizador no se encuentra cerca del objetivo, su activación por la luz formará especies tóxicas de oxígeno en lugares no deseados (Amaral, Amorim, Nunes, Soares y Silveira, 2010).

Las investigaciones son discutidas en torno al tiempo de pre-irradiación, sin embargo, algunos datos muestran que los tiempos van de 5 a 15 minutos (Fimple *et al.*, 2008; Pagonis *et al.*, 2010).

En la terapia fotodinámica antimicrobiana, se espera que, durante el tiempo de pre-irradiación, el fotosensibilizador se una al microorganismo o supere la barrera de su membrana celular y no se degrade antes de ser activada por la fuente de luz (Amaral *et al.*, 2010).

La luz, al interactuar con los tejidos biológicos, puede ser reflejada, absorbida, difundida o transmitida (Núñez *et al.*, 2013).

La reflexión se produce cuando la luz, al incidir en el tejido, se refleja por falta de afinidad, mientras que la absorción, por el contrario, se produce cuando al incidir la luz en el tejido, esta es absorbida por la afinidad entre ambos. Por otro lado, la difusión se produce cuando la luz penetra en el tejido a una profundidad no uniforme con respecto al punto de interacción. Asimismo, la transmisión se produce cuando la luz pasa a través del tejido sin afinidad y sin efecto (Olivi, 2013).

En la terapia fotodinámica el modo de interacción que prevalece es la absorción, puesto que el fotosensibilizador se encarga de absorber la energía de la fuente de luz para producir su acción fotodinámica. Por ello, la fuente de luz debe tener una longitud de onda compatible con la banda de absorción del fotosensibilizador (Núñez *et al.*, 2013).

Las longitudes de onda más utilizadas en terapia fotodinámica se encuentran entre el intervalo de 660 nm (rojo) y 1000 nm (infrarrojo) debido a la mayor profundidad de penetración de estas longitudes de onda en los tejidos biológicos. Asimismo, esta capacidad de penetración se debe a dos factores: primero, porque la luz se difunde en la dirección de propagación del haz y segundo, porque la absorción de la luz en ese intervalo de longitudes de onda (roja e infrarroja) por el agua y la sangre (mayores componentes de los tejidos biológicos) es pequeña, así la transmisión del haz es favorecida y permite una interacción más relevante con los tejidos más profundos (Núñez *et al.*, 2013).

Se han estudiado otras longitudes de onda de la luz como el azul, verde y la luz blanca *in vitro* para la eliminación de microorganismos cariogénicos y periodontales, obteniéndose buenos resultados (Komerik *et al.*, 2003).

Las primeras fuentes de luz que se usaron en la PDT fueron las lámparas convencionales, que emitían una luz policromática y no coherente, además de un fuerte componente térmico asociado (Amaral *et al.*, 2010).

Posteriormente, se usaron fuentes de luz más novedosas y con propiedades especiales como el láser y el LED (diodo emisor de luz), los cuales actualmente son los más recomendados para la PDT (Núñez *et al.*, 2013).

La palabra láser deriva del acrónimo inglés LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) es decir, Amplificación de luz por emisión estimulada de radiación. El láser proporciona una forma de emisión de radiación luminosa con características especiales de monocromaticidad (todos los fotones poseen la misma longitud de onda), direccionalidad (posee escasa divergencia) y coherencia (todos los fotones se encuentran en fase temporal y espacial). Todas estas características le han permitido al láser un gran número de aplicaciones, no solo en la Odontología, sino también en otras áreas como la tecnología y la medicina (Martinez, Pastor y Sendra, 1998).

La buena monocromaticidad y poca divergencia del láser son ventajas importantes que hacen más fácil su aplicación en la terapia fotodinámica. Asimismo, el láser, al tener toda su energía concentrada en una fina región espectral, permite determinar fácilmente la cantidad de energía absorbida por el fotosensibilizador (Núñez *et al.*, 2013).

La interacción del láser con el tejido objetivo, ya sea por absorción o difusión, crea efectos biológicos responsables de aspectos terapéuticos. Los efectos pueden ser: fototérmico, fotomecánico, fotoacústico o fotoquímico. En la terapia fotodinámica, el efecto biológico producido es el fotoquímico (Olivi, 2013).

Inicialmente se utilizaron láseres de argón, Nd: YAG, oro o vapor de cobre ya que permitían la activación del fotosensibilizador, sin embargo, eran complejos y costosos (Konopka & Goslinski, 2007).

Posteriormente se utilizaron los láseres de diodo (DL), que fueron desarrollados con una luz monocromática y coherente para facilitar su asociación con el fotosensibilizador. Esta luz puede transmitirse mediante una fibra óptica, para mejor su acceso a la lesión objetivo. Hoy en día, se utiliza el láser de diodo de baja potencia para la terapia fotodinámica, en el espectro de rojo, debido a que son bien absorbidos por los tejidos biológicos (Amaral *et al.*, 2010).

Además, se utiliza la longitud de onda de activación más larga del fotosensibilizador para producir una penetración más profunda de la luz. Por ello, la mayoría de los fotosensibilizadores se activan con luz roja entre 630 y 700 nm, que corresponde a una profundidad de penetración de luz de 0,5 cm a 630 nm y 1,5 cm a 700 nm (Salva, 2002).

En cuanto a los LED (diodos emisores de luz), son otra fuente de luz alternativa para la PDT, ya que también presentan una luz monocromática y un bajo componente térmico (Walsh, 2003).

La dosis de irradiación se refiere a la energía o cantidad de luz que va a ser depositada sobre el objetivo. La dosis de irradiación depende de la potencia (P) de la fuente de luz (láser), expresada en Watts (W) y el tiempo (t) de aplicación del mismo, expresado en segundos (s). Y se expresa mediante la fórmula de la energía ($E = P \times t$) en Julios (J). Asimismo, la fluencia es la velocidad a la que se deposita la energía en un área determinada y se expresa en J/cm^2 (Trindade, De Figueiredo, Steier & Weber, 2015).

La terapia fotodinámica produce una susceptibilidad mayor en las bacterias Gram (+) que en las bacterias Gram (-). Esto, debido a que la membrana citoplasmática de las bacterias Gram (+) es porosa y está envuelta por peptidoglicanos y ácido lipoteicoico, lo cual permite el paso del

fotosensibilizador. Mientras que las bacterias Gram (-) tienen una membrana citoplasmática interna y otra externa, las cuales están separadas por un periplasma que contiene peptidoglicanos y forman una barrera física y funcional entre la célula y su ambiente. De esta manera, para que se produzca la inactivación bacteriana es necesario que el fotosensibilizador sea absorbido por la membrana celular y/o sea trasladado al citoplasma provocando así la inhibición del ADN, ARN y la síntesis de proteínas (Trindade *et al.*, 2015).

Dentro de las ventajas de la terapia fotodinámica antimicrobiana destacan: su amplio espectro de acción, ya que el fotosensibilizador puede actuar sobre bacterias, hongos, virus y protozoarios y su eficacia independiente del patrón de resistencia antimicrobiana. Además, presenta baja o ninguna toxicidad y no se desarrolla resistencia de la célula-objetivo después de múltiples tratamientos (Núñez *et al.*, 2013).

En cuanto a las desventajas de la terapia fotodinámica antimicrobiana se subraya: la necesidad de una fuente de luz para que el fotosensibilizador pueda activarse. Además, requiere de una precisa profundidad de penetración de la luz para que las células objetivo y el fotosensibilizador puedan ser accesibles a la energía de la radiación. Otra desventaja sería su mayor costo, ya que depende del uso de la fuente de luz y también requiere el uso de un equipo de protección específico para la aplicación de la fuente de luz (Núñez *et al.*, 2013).

III. Método

3.1 Tipo de investigación

Experimental, prospectivo, transversal y comparativo

3.2 Ámbito temporal y espacial

3.2.1 Ámbito temporal

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en los meses de abril hasta septiembre del 2019.

3.2.2 Ámbito espacial

Los ambientes donde se realizó la investigación fueron; las instalaciones de la clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Federico Villarreal y el Laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue, para los cuales se gestionaron los permisos pertinentes. (Anexos 2 y 3)

3.3 Variables

3.3.1 Variables

- Variable dependiente: Efecto antibacteriano
- Variable independiente: Fotosensibilizadores (azul de metileno y verde de malaquita)

3.3.2 Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	ESCALA	VALOR
Efecto antibacteriano	Capacidad de destruir o inhibir el crecimiento bacteriano que posee un agente antimicrobiano	Crecimiento bacteriano	Unidad formadora de colonias	Razón	0-x colonias

3.4 Población y muestra

3.4.1 Población

La población estuvo conformada por piezas dentarias correspondientes a premolares humanos monorradiculares.

3.4.2 Muestra

Se realizó un trabajo piloto previo para definir el tamaño muestral, el cual fue de 10 premolares humanos monorradiculares por grupo.

La muestra fue distribuida en 3 grupos de la siguiente manera:

Grupo LS+AM: 10 premolares humanos monorradiculares tratados con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%

Grupo LS+VM: 10 premolares humanos monorradiculares tratados con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005%

Grupo control: 10 premolares humanos monorradiculares no tratados

3.4.3 Criterios de selección

3.4.3.1 Criterios de inclusión

- Premolares monorradiculares permanentes extraídas recientemente y conservadas en suero fisiológico
- Premolares monorradiculares con similitud en tamaño y forma
- Premolares monorradiculares con conducto único y recto
- Premolares monorradiculares sin presencia de fracturas radiculares
- Premolares monorradiculares sin calcificaciones

3.4.3.2 Criterios de exclusión

- Premolares con lesiones cariosas extensas
- Premolares con enanismo radicular
- Premolares con curvaturas
- Premolares con tratamiento de endodoncia previa
- Premolares monorradiculares con hipercementosis
- Premolares birradiculares
- Raíces con formación apical incompleta
- Raíces con signos de reabsorción externa y/o interna

3.5 Instrumentos

La recolección de datos se realizó mediante el método de observación directa y se utilizó la técnica de recuento de colonias por placa para la cuantificación de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), la cual fue realizada por un especialista (Microbiólogo). Los datos obtenidos del estudio fueron registrados en una ficha elaborada por el investigador. (Anexo 1)

3.6 Procedimientos

1.- Recolección de la muestra:

Se recolectaron premolares humanos monorradiculares permanentes recientemente extraídas, se sumergieron en un recipiente con una solución de hipoclorito de sodio al 4% durante 2 horas para eliminar las impurezas, los restos de tejido se removieron con una cureta periodontal y se conservaron en suero fisiológico a temperatura ambiente, hasta su posterior uso. (Anexo 8, Imágenes 1 y 2)

2.- Selección de la muestra:

Se seleccionaron 30 premolares monorradiculares que presentaron una longitud total promedio de 22 mm, la presencia de un solo conducto fue comprobada mediante radiografías periapicales tomadas en 2 angulaciones distintas, buco-lingual y mesio-distal, y se realizó en la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Federico Villarreal. (Anexo 8, Imágenes 3, 4 y 5)

3.- Preparación de las muestras:

Los dientes fueron preparados en la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

Una vez seleccionadas las muestras, se les seccionaron las coronas utilizando un micromotor de mano MARATHON (Saeyang Microtech Co., Ltd., Daegu, Corea del Sur) y un disco de corte DIAMOND DISC (Hm22D20) a 35000 RPM (revoluciones por minuto) para estandarizar su longitud a 15 mm. Esta longitud estándar permitió las condiciones similares de preparación del conducto radicular y la aplicación de la terapia fotodinámica en todas las muestras. (Anexo 8, Imágenes 6-9)

Se determinó la longitud de trabajo usando una lima tipo K #10 (Dentply/Maillefer, Ballaiges, Suiza) y se realizó una instrumentación mecánica, hasta 1 mm antes del foramen apical. (Anexo 8, Imagen 10)

Los conductos se prepararon con el sistema rotatorio PROTAPER NEXT (Dentply/Maillefer, Ballaiges, Suiza), utilizando los instrumentos según lo recomendado por el fabricante: Proglider, X1, X2 y X3. La preparación del tercio apical se concluyó con el instrumento X3, que tiene un diámetro de punta correspondiente a 0.30 mm. (Anexo 8, Imágenes 11-17)

En cada cambio de instrumento, la irrigación y aspiración se realizaron con 2 ml de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 4% con una aguja NaviTip 30-G (Ultradent, South Jordan, UT, EE.UU.). Al final de la preparación se irrigó el conducto con 3 ml de EDTA al 17 % (Maquira, Maringá, Brasil), luego con 5 ml de solución fisiológica y se secó con conos de papel estériles 30.04 (Spident Co., Ltd., Incheon, Corea del Sur). (Anexo 8, Imágenes 18-21)

Seguidamente, cada pieza dentaria se colocó verticalmente en tubos crioviales previamente rotulados y fueron fijados por bloques de un material de silicona Zetaplus (Zhermack SpA, Badia Polesine (RO), Italia). Luego fueron colocadas en una caja autoclavable y se procedió a la esterilización de las muestras en autoclave a 121°C durante 20 minutos. (Anexo 8, Imágenes 22, 23 y 24)

4.- Inoculación de la cepa bacteriana:

El procedimiento microbiológico de la investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue. Todos los procedimientos se realizaron usando un mechero Bunsen, cercano al área de trabajo (radio de 15 cm), para proporcionar un ambiente aséptico. (Anexo 8, Imagen 25)

La cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fue adquirida de un laboratorio especializado GENLAB y fue cultivada siguiendo las especificaciones del fabricante. (Anexo 8, Imagen 26)

Se cultivó la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en Agar Soya Trypticasa (TSB) (Difco, Detroit, MI, EE. UU) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Las bacterias se sembraron en un medio de Agar Sangre con base de Soya Trypticasa (TSA) (Difco, Detroit, MI, EE. UU) y se incubaron a 37°C durante 48 horas. (Anexo 8, Imagen 27)

La suspensión bacteriana se preparó en solución salina estéril, a una concentración equivalente a 0.5 McFarland y la densidad óptica se midió usando un turbidímetro (MicroScanturbidetMiller,. SIEMENS,. USA) a una longitud de onda de 620 nm que indica un grado de absorbancia entre 0.8 a 0.10 y a una concentración equivalente a $1.5 - 2.0 \times 10^8$ UFC/ml. Luego la suspensión bacteriana se mezcló con caldo cerebro corazón (BHI) en una relación 1:1. (Anexo 8, Imágenes 28-31)

Posteriormente, se inoculó la suspensión bacteriana en cada conducto radicular hasta llenarlo completamente, utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml y aguja Navitip 30G (Ultradent, South Jordan, UT, EE.UU.). La suspensión bacteriana se inoculó hasta visualizar un sobrepase de éste en la porción apical, inmediatamente se secó con gasa estéril el ápice radicular para poder sellar los forámenes de cada raíz con una resina fotoactivada Estelite posterior (Tokuyama Dental Corporation, Tokio, Japón) y de esta manera evitar la filtración bacteriana a través del ápice durante la inoculación. (Anexo 8, Imágenes 32-36)

Las piezas dentarias fueron incubadas durante 21 días para la formación de biofilm en condiciones microaerofílicas a 37°C. El TSB fue reemplazado cada 48 horas por BHI estéril. (Anexo 8, Imagen 37)

Luego del periodo de contaminación, las muestras fueron divididas aleatoriamente en 3 grupos (n=10): LS+AM (Irradiación con láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno), LS+VM (Irradiación con láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita) y control (sin tratamiento).

5.- Aplicación de la Terapia fotodinámica:

La aplicación de la terapia fotodinámica fue realizada en la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Todo el procedimiento se realizó usando dos mecheros convencionales, muy cercanos al área de trabajo (radio de 8 – 10 cm), para proporcionar un ambiente aséptico. (Anexo 8, Imagen 38)

Para el grupo LS+AM, se utilizó una solución de Chimiolux (Azul de metileno al 0.005%) (DMC, São Paulo, Brasil) como fotosensibilizador. (Anexo 8, Imagen 39)

Previamente a su aplicación, se eliminó el exceso de medio de cultivo de los conductos radiculares, para lo cual se irrigó con 2 ml de solución fisiológica (NaCl al 0.9%) y se secó con conos de papel estériles 30.04 (Spident Co., Ltd., Incheon, Corea del Sur). Seguidamente, se aplicó el fotosensibilizador azul de metileno al 0.005% en cada conducto radicular con una jeringa de tuberculina y aguja NaviTip 30G (Ultradent, South Jordan, UT, EE.UU.) sin desbordamiento y se dejó ahí durante 5 minutos (pre-irradiación). (Anexo 8, Imágenes 40-43)

Para el grupo LS+VM, se utilizó una solución de verde de malaquita al 0,005% como fotosensibilizador. Esta solución se preparó disolviendo el polvo de verde de malaquita (oxalato de verde de malaquita) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) en agua destilada estéril para lograr dicha concentración y a continuación se filtró a través de una membrana estéril (diámetro de poros de 0,22 μm ; MS®, Tokio, Japón) en un recipiente previamente esterilizado para su posterior uso. (Anexo 8, Imagen 44)

De igual manera, antes de su aplicación, se eliminó el exceso de medio de cultivo de los conductos radiculares, para lo cual se irrigó con 2 ml de solución fisiológica (NaCl al 0,9%) y se secó con conos de papel estériles 30.04 (Spident Co., Ltd., Incheon, Corea del Sur).

Seguidamente, se aplicó el fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005% en cada conducto radicular con una jeringa de tuberculina y aguja NaviTip 30G sin desbordamiento y se dejó ahí durante 5 minutos (pre-irradiación). (Anexo 8, Imágenes 45 y 46)

Pasado el tiempo de pre-irradiación de los fotosensibilizadores, se continuó con la irradiación de la luz láser, para lo cual se utilizó el dispositivo láser Therapy XT (DMC, São Paulo, Brasil) con una longitud de onda de 660 nm (roja) y un Tip de 200 μm de diámetro (DMC, São Paulo, Brasil). (Anexo 8, Imágenes 47 y 48)

Para la aplicación del láser se tomó como referencia el protocolo propuesto por el Núcleo de pesquisa e ensino de fototerapia nas ciências da saúde (NUPEN), donde se sugieren aplicar los siguientes parámetros: potencia de 100 mW, dosis de 320 J/cm^2 y 9 J de energía. (Anexo 5)

La irradiación de la luz láser se realizó colocando el Tip dentro del conducto radicular a 2 mm de la longitud de trabajo, efectuando movimientos en espiral de apical a cervical para permitir una adecuada distribución de la luz dentro del mismo. El tiempo de irradiación tanto para el grupo LS+AM como para el grupo LS+VM fue de 90 segundos. (Anexo 8, Imagen 49)

Después de eso, se irrigó cada conducto radicular de ambos grupos con 5 ml de solución fisiológica (NaCl al 0.9%) para evacuar el fotosensibilizador desactivado. (Anexo 8, Imagen 50)

Para el grupo control no se realizó ningún tratamiento, los conductos radiculares solo fueron inoculadas con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

6.- Toma de la Muestra:

Después de los tratamientos respectivos, se llenó cada conducto radicular de los grupos LS+AM, LS+VM y control con 2 ml solución fisiológica (NaCl al 0,9%) usando una jeringa de tuberculina estéril y una aguja NaviTip 30G (Ultradent, South Jordan, UT, EE.UU.). Luego se colocó un cono de papel 30.04 (Spident Co., Ltd., Incheon, Corea del Sur). en cada conducto y se agitó en forma circunferencial contactando con las paredes dentinarias durante 30 segundos para tomar las respectivas muestras. (Anexo 8, Imagen 51)

Seguidamente, los conos de papel se colocaron en tubos crioviales estériles, estos a su vez fueron ubicados en una caja autoclavable, la cual se mantuvo en un cooler sellado con hielo (para mantener una temperatura constante) y fue transportado al laboratorio. (Anexo 8, Imágenes 52 y 53)

7.- Análisis microbiológico:

Para la siembra de *Enterococcus faecalis*, se utilizó el método de agotamiento de asa, en primer lugar, se agregó 1 ml de solución fisiológica (NaCl al 0.9%) en cada tubo criovial, que a su vez contenía un cono de papel, y se agitó por 60 segundos para que la muestra sea diluida y homogenizada. (Anexo 8, Imágenes 54, 55 y 56)

Seguidamente se tomó una muestra representativa de 10 µl con un asa calibrada estéril y se sembró en Agar Enterococcosel (Agar selectivo para *Enterococcus*) a 37°C durante 48 horas. (Anexo 8, Imagen 57)

Luego del periodo de incubación, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada uno de los grupos mediante el método de recuento por placa. Asimismo, el recuento de colonias de *Enterococcus faecalis* fue calculado y expresado en UFC/ml. (Anexo 8, Imágenes 58, 59 y 60)

3.7 Análisis de datos

Los datos obtenidos del presente estudio se procesaron y analizaron mediante estadística descriptiva e inferencial utilizando el programa Microsoft Excel 2016 y el programa estadístico Stata v.15 respectivamente.

Inicialmente se elaboró una base de datos en una hoja de cálculo de Microsoft Excel con los resultados obtenidos del experimento realizado.

Puesto que, los valores del recuento bacteriano obtenidos se expresaron en unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), y al ser éstos de naturaleza cuantitativa, se calcularon las medidas de tendencia central como la media y la mediana, valores mínimos y máximos y medidas de dispersión como la desviación estándar para su análisis estadístico descriptivo. Los datos resumidos fueron presentados en tablas, asignándose los valores descriptivos calculados. Asimismo, se utilizaron gráficos de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos.

Por otro lado, para el análisis estadístico inferencial se utilizaron pruebas no paramétricas, debido a que los valores obtenidos no presentaron una distribución normal. Por ello, se utilizó la prueba de Suma de rangos de Wilcoxon – U de Mann Whitney para comparar dos grupos independientes y la prueba de Kruskal Wallis para comparar tres grupos independientes.

Todas las pruebas estadísticas utilizadas fueron verificadas a un nivel de confianza del 95% y nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$).

3.8 Consideraciones éticas

Para el presente trabajo de investigación experimental se utilizaron como unidades de estudio a dientes premolares humanos monorradiculares que fueron extraídos por motivos ortodónticos. Los pacientes dieron su consentimiento para la utilización de sus piezas dentarias extraídas en la presente investigación. No existe vulneración ética en el procedimiento ya que las exodoncias para obtener los especímenes fueron realizadas por motivos terapéuticos ajenos al presente estudio. (Anexo 7)

IV. Resultados

De acuerdo a los objetivos planteados, en el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), se obtuvieron los siguientes resultados:

El recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *E. faecalis* ATCC 29212 en el grupo LS+AM (Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%) tuvo un promedio de 530 ± 581.28 . Asimismo, el 50% de las muestras presentaron 250 UFC/ml o más (Tabla 1, *Figura I*).

Tabla 1

Recuento de UFC/ml de E. Faecalis ATCC 29212 del grupo LS+AM

Grupo	N°	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo
LS+AM	10	530	581.2821	250	0	1600

LS+AM: Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%,

DS: Desviación estándar.

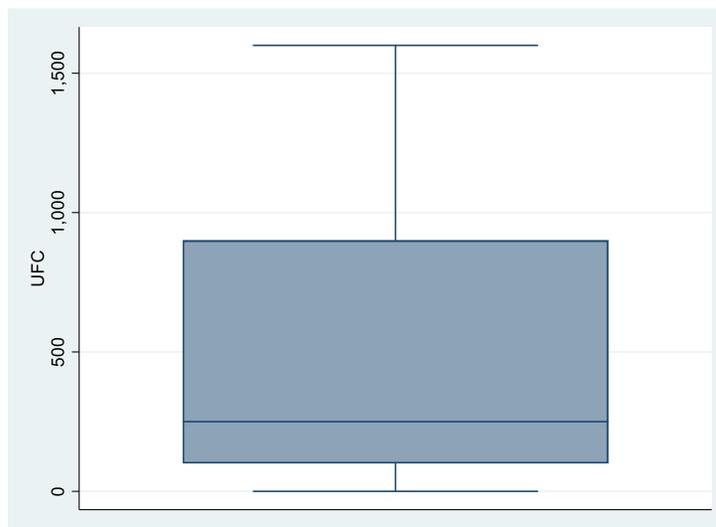


Figura I. Recuento de UFC/ml de E. Faecalis ATCC 29212 del grupo LS+AM.

El recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *E. faecalis* ATCC 29212 en el grupo LS+VM (Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005%) tuvo un promedio de 1990 ± 542.525 . Asimismo, el 50% de las muestras presentaron 1900 UFC/ml o más (Tabla 2, Figura II).

Tabla 2

Recuento de UFC/ml de E. Faecalis ATCC 29212 del grupo LS+VM

Grupo	N°	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo
LS+VM	10	1990	542.525	1900	1200	3300

LS+VM: Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005%,

DS: Desviación estándar.



Figura II. Recuento de UFC/ml de E. Faecalis ATCC 29212 del grupo LS+VM.

El recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *E. faecalis* ATCC 29212 en el grupo control (sin tratamiento) tuvo un promedio de 11430 ± 2352.33 . Asimismo, el 50% de las muestras presentaron 10900 UFC/ml o más (Tabla 3, Figura III).

Tabla 3

Recuento de UFC/ml de E. Faecalis ATCC 29212 del grupo control

Grupo	N°	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo
Control	10	11430	2352.3270	10900	8400	15000

Control: Sin tratamiento; DS: Desviación estándar.

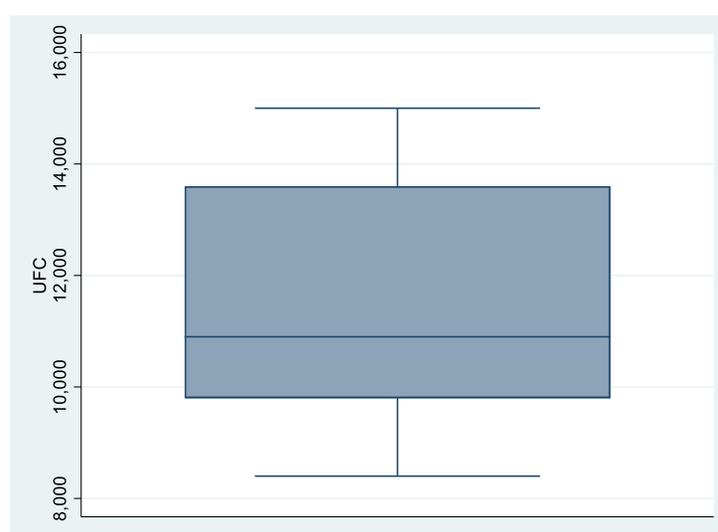


Figura III. Recuento de UFC/ml de *E. Faecalis* ATCC 29212 del grupo control.

Al comparar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de *E. Faecalis* ATCC 29212 entre los grupos LS+AM (Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%) y LS+VM (Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005%) se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). Siendo el grupo LS+AM el que tuvo un recuento bacteriano significativamente menor que el grupo LS+VM (Tabla 4, *Figura IV*).

Tabla 4

Comparación del recuento de (UFC/ml) entre los grupos LS+AM y LS+VM

Grupo	N°	Media	DS	Mediana	Zw	P
LS+AM	10	530	581.28	250	- 3.602	0.0003*
LS+VM	10	1990	542.53	1900		

LS+AM: Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%;

LS+VM: Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005%;

DS: Desviación estándar; 2 Zw: Prueba de suma de rangos de Wilcoxon - U de Mann Whitney;

*Diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

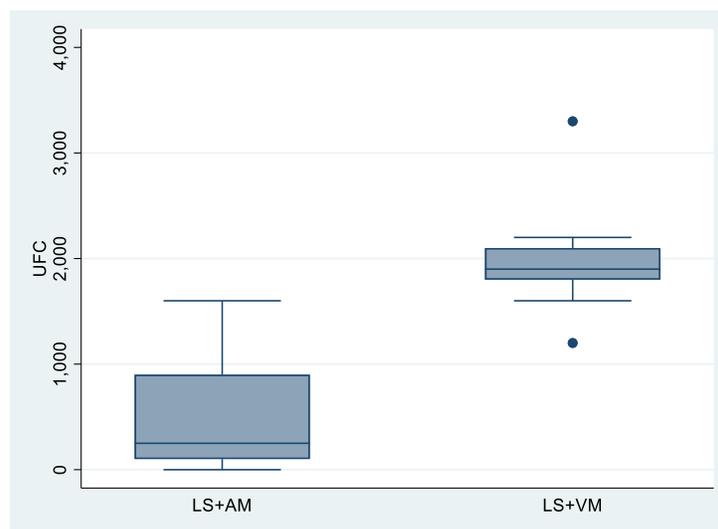


Figura IV. Comparación del recuento de (UFC/ml) entre los grupos LS+AM y LS+VM.

Al comparar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *E. Faecalis* ATCC 29212 entre los grupos LS+AM (Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%) y control (sin tratamiento) se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). Siendo el grupo LS+AM el que tuvo un recuento bacteriano significativamente menor que el grupo control (Tabla 5, Figura V).

Tabla 5

Comparación del recuento de UFC/ml entre los grupos LS+AM y control

Grupo	N°	Media	DS	Mediana	Zw	P
LS+AM	10	530	581.28	250	3.785	0.0002*
Control	10	11430	2352.3270	10900		

LS+AM: Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%;

Control: Sin tratamiento; DS: Desviación estándar; Zw: Prueba de suma de rangos de Wilcoxon -

U de Mann Whitney. *Diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

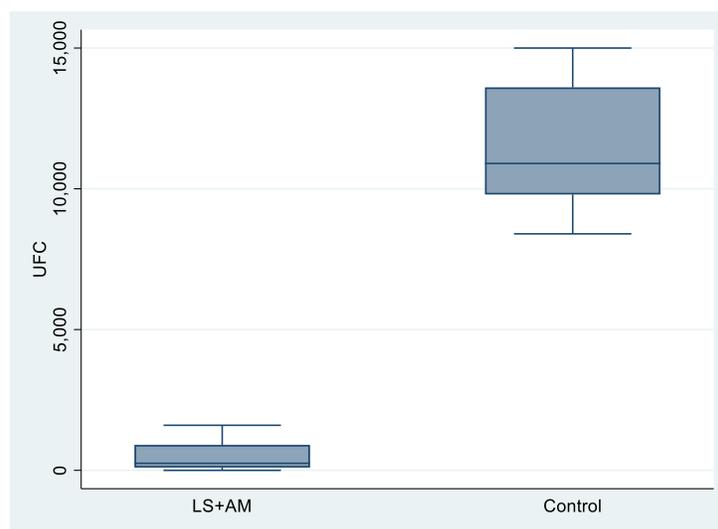


Figura V. Comparación del recuento de UFC/ml entre los grupos LS+AM y control.

Al comparar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *E. Faecalis* ATCC 29212 entre los grupos LS+VM (Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005%) y control (sin tratamiento) se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). Siendo el grupo LS+VM el que tuvo un recuento bacteriano significativamente menor que el grupo control (Tabla 6, Figura VI).

Tabla 6

Comparación del recuento de UFC/ml entre los grupos LS+VM y control

Grupo	N°	Media	D.S.	Mediana	Zw	P
LS+VM	10	1990	542.53	1900	-3.784	0.0002*
Control	10	11430	2352.3270	10900		

LS+VM: Tratamiento del láser rojo y el fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005%;

Control: Sin tratamiento; DS: Desviación estándar; Zw: Prueba de suma de rangos de Wilcoxon -

U de Mann Whitney. *Diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

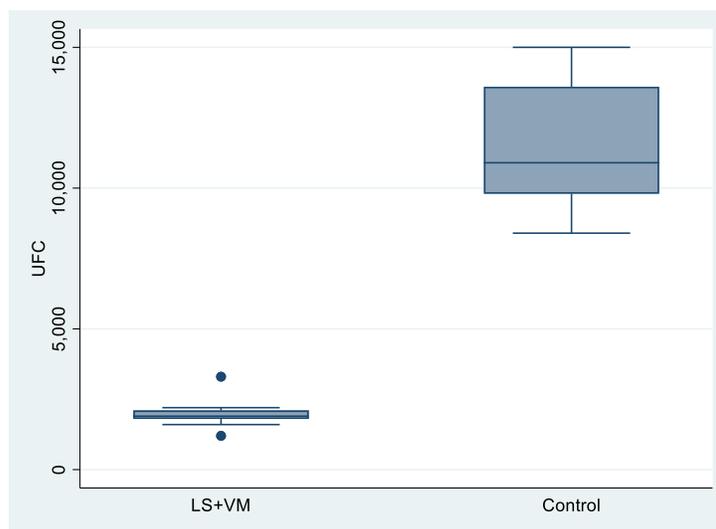


Figura VI. Comparación del recuento de UFC/ml entre los grupos LS+VM y control.

Al comparar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de *E. Faecalis* ATCC 29212 entre los grupos LS+AM (Irradiación del láser rojo asociado al azul de metileno al 0.005%), LS+VM (Irradiación del láser rojo asociado al verde de malaquita al 0.005%) y control (sin tratamiento) se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). Siendo el grupo LS+AM el que tuvo un recuento bacteriano significativamente menor que los grupos LS+VM y control respectivamente (Tabla 7, Figura VII).

Tabla 7

Comparación del recuento de UFC/ml entre los grupos LS+AM, LS+VM y control

Grupo	N°	Media	D.S.	Mediana	X^2_k	P
LS+AM	10	530	581.28	250		
LS+VM	10	1990	542.53	1900	25.222	*0.0001
Control	10	11430	2352.3270	10900		

LS+AM: Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%;

LS+VM: Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005%;

Control: Sin tratamiento; DS: Desviación estándar; X^2_k : Prueba de Kruskal Wallis. *Diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

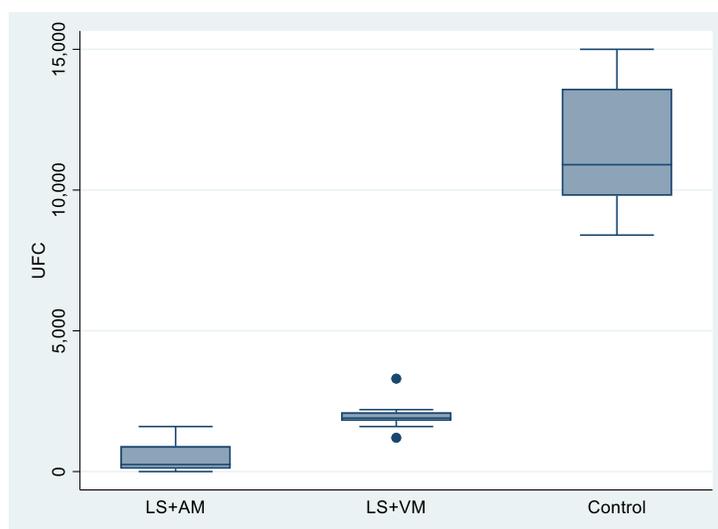


Figura VII. Comparación del recuento de UFC/ml entre los grupos LS+AM, LS+VM y control.

V. Discusión de resultados

Uno de los principales objetivos de la endodoncia es la completa desinfección del sistema de conductos radiculares (Arnabat, 2015).

Sin embargo, debido a la resistencia de los microorganismos presentes en los conductos radiculares al tratamiento endodóntico convencional, se ha demostrado que su eliminación completa, es muy difícil de conseguir (Núñez *et al.*, 2013).

Siendo el *E. faecalis* uno de los microorganismos más resistentes y causantes de infecciones secundarias de los conductos radiculares (Cohen *et al.*, 2011).

Por lo que, se ha sugerido a la terapia fotodinámica (PDT) como una alternativa y/o complemento al tratamiento endodóntico convencional, debido a su baja toxicidad y principalmente porque los microorganismos no presentan resistencia a sus efectos terapéuticos (Núñez *et al.*, 2013).

Asimismo, existen algunas variables para tener en cuenta al momento de aplicar la terapia fotodinámica, incluyendo la fuente de luz específica, los fotosensibilizadores y los parámetros de irradiación.

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto antibacteriano del láser rojo usando diferentes fotosensibilizadores en premolares humanos monorradiculares contaminados con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Los fotosensibilizadores usados en el presente estudio fueron el azul de metileno y el verde de malaquita, ambos a una concentración al 0.005% para una comparación directa. Ambos fueron asociados a un láser con una longitud de onda de 660 nm (roja) por su compatibilidad con el espectro de absorción. El dispositivo láser se usó con una potencia de 100 mW y durante 90

segundos para obtener una energía de 9 J. Asimismo, se evaluó un grupo control donde no se aplicó ningún tratamiento.

El grupo con irradiación del láser rojo asociado al azul de metileno presentó una mayor reducción bacteriana, respecto al grupo con irradiación del láser rojo asociado al verde de malaquita y grupo control. Asimismo, el grupo con irradiación del láser rojo asociado al verde de malaquita presentó una reducción bacteriana estadísticamente significativa respecto al grupo control.

En el presente estudio se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) expresado en UFC/ml, el cual es uno de los métodos más empleados para este tipo de estudios, para evaluar el efecto antibacteriano de los tratamientos propuestos.

Sebrão *et al.* (2017) realizaron un estudio donde se comparó la eficacia de los fotosensibilizadores rosa de bengala y azul de metileno para reducir la viabilidad de *Enterococcus Faecalis*. Se usaron diferentes concentraciones y fuentes de luz: para el azul de metileno se usó una concentración de 31,2 $\mu\text{mol/L}$ (0.01%) asociado a un láser con longitud de onda de 660 nm (rojo) y para la rosa de bengala se usó una concentración de 25 $\mu\text{mol/L}$ asociado a un láser con una longitud de onda de 532 nm (verde). Asimismo, ambos dispositivos láser se usaron con una potencia de 40 mW y durante 180 segundos para obtener una energía de 7.2 J. Se obtuvo que el fotosensibilizador azul de metileno no presentó diferencias significativas respecto al control, lo cual difiere con los resultados del presente estudio, donde el azul de metileno sí mostró diferencias altamente significativas en comparación con el control.

Un factor a considerar en ese estudio es que se usó una menor cantidad de energía (7.2 J) con el dispositivo láser, dando como resultado una menor reducción bacteriana a diferencia del presente estudio donde la energía usada fue mayor (9 J). Asimismo, al comparar ambos

fotosensibilizadores entre sí, mostraron diferencia significativa, siendo rosa de bengala la que mostró mejores resultados (Sebrão *et al.*, 2017).

Silva *et al.* (2014) realizaron un estudio donde se comparó el efecto antibacteriano de los fotosensibilizadores azul de metileno y verde de malaquita, ambos con una concentración al 0.1% y asociados a un láser con longitud de onda de 660 nm (rojo), sobre el *Enterococcus faecalis*. Asimismo, el dispositivo láser se usó con una potencia de 40 mW y durante 30, 60 y 120 segundos para obtener energías de 1.2 J, 2.4 J y 4.8 J respectivamente. Se obtuvo que ambos fotosensibilizadores presentaron diferencias significativas respecto al control (durante 60 y 120 segundos), resultados similares a los del presente estudio. Sin embargo, al ser comparados ambos fotosensibilizadores entre sí, no mostraron diferencia significativa, lo cual difiere con los resultados de la presente investigación donde el azul de metileno y verde de malaquita, al ser comparados entre sí, mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Un factor a tomar en cuenta en ese estudio es la mayor concentración de los fotosensibilizadores utilizados (0.1%), dando como resultado una mayor reducción bacteriana a diferencia del presente estudio donde la concentración usada fue menor (0.005%). Sin embargo, dicha concentración al 0.1% puede ocasionar cambios de coloración en las piezas dentarias, resultando poco conveniente para su aplicación clínica (Costa *et al.*, 2016).

Otro factor a considerar es que en ese estudio se utilizaron tubos de ensayo en lugar de piezas dentarias, lo cual puede resultar poco práctico clínicamente ya que en el presente estudio se usaron piezas dentarias, precisamente para darle las condiciones más parecidas posibles a la clínica tanto para el crecimiento bacteriano como para la aplicación de los tratamientos.

Por lo cual, ya que la asociación del láser rojo con ambos fotosensibilizadores en una concentración al 0.005% (ya sea azul de metileno o verde de malaquita) mostró un efecto

antibacteriano significativo frente al *Enterococcus faecalis*, se deja abierta la posibilidad de realizar más estudios del fotosensibilizador verde de malaquita con nuevas concentraciones y fuentes de luz específicas para promover su utilización como alternativa al fotosensibilizador azul de metileno en la terapia fotodinámica y su aplicación en la endodoncia.

VI. Conclusiones

- La irradiación del láser rojo asociado tanto al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005% como al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005% presentó un efecto antibacteriano estadísticamente significativo en ambos casos.
- La irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005% presentó un recuento significativamente menor de UFC/ml de *Enterococcus faecalis* en comparación con la irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005%, por ende, un mejor efecto antibacteriano.
- La irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005% presentó un recuento significativamente menor de UFC/ml de *Enterococcus faecalis* en comparación con el control, demostrando su efecto antibacteriano.
- La irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005% presentó un recuento significativamente menor de UFC/ml de *Enterococcus faecalis* en comparación con el control, demostrando su efecto antibacteriano.

VII. Recomendaciones

- Se recomienda realizar más estudios del fotosensibilizador verde de malaquita en nuevas concentraciones y fuentes de luz específicas para promover su utilización como alternativa al fotosensibilizador azul de metileno en la terapia fotodinámica y su aplicación en la endodoncia.
- Se recomienda realizar más estudios sobre otros fotosensibilizadores y fuentes de luz específicas para poder conocer sus efectos terapéuticos.
- Se recomienda realizar más estudios sobre el efecto antibacteriano de la terapia fotodinámica frente a otros microorganismos que al igual que el *Enterococcus faecalis* son causantes de múltiples procesos infecciosos.
- Para futuros estudios relacionados con este trabajo, se recomienda aumentar el número de muestras para poder comprobar de manera más precisa la diferencia significativa existente entre los grupos.
- Se recomienda utilizar otros métodos novedosos diferentes al de UFC (unidades formadoras de colonias) para el recuento de bacterias, ya que, en la actualidad existen la microscopia electrónica de barrido y la microscopia con focal láser de barrido, las cuales permiten tener lecturas cada vez más exactas.

VIII. Referencias

- Amaral, R., Amorim, J., Nunes, E., Soares, J. y Silveira, F. (2010). Terapia fotodinâmica na endodontia: revisão de literatura. *RFO UPF*, 15(2), 207-211. Recuperado de http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-40122010000200020&lng=pt&tlng=pt
- Arnabat-Dominguez, J. (2015, marzo). Aplicaciones del láser en endodoncia. *Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*. Recuperado de <https://www.selo.org.es/descargas/RCOE-20.pdf>
- Cohen, S., Hargreaves, K. y Berman, L. (2011). *Vías de la Pulpa*. Barcelona, España: Elsevier.
- Costa, L., Matos, F., Correia, A., Carvalho, N., Faria-e-Silva, A., Paranhos, L. y Ribeiro, M. (2016). Tooth color change caused by photosensitizers after photodynamic therapy: An in vitro study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 160, 225-228. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.04.019
- Costerton, J., Stewart, P. y Greenberg, E. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318
- Da Frota, M., Guerreiro-Tanomaru, J., Tanomaru-Filho, M., Bagnato, V., Espir, C. y Berbert, F. (2014). Photodynamic therapy in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer. *Lasers in Medical Science*, 30(7), 1867-1872. doi: 10.1007/s10103-014-1696-z
- Dougherty, T. (1987). Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochemistry and Photobiology*, 45(6), 879-889. doi: 10.1111/j.1751-1097.1987.tb07898.x

- Fimple, J., Fontana, C., Foschi, F., Ruggiero, K., Song, X., Pagonis, T.,...Soukos, N. (2008). Photodynamic Treatment of Endodontic Polymicrobial Infection in Vitro. *Journal of Endodontics*, 34(6), 728-734. doi: 10.1016/j.joen.2008.03.011
- Ghinzelli, G., Souza, M., Cecchin, D., Farina, A. y de Figueiredo, J. (2014). Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus faecalis* – an in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11, 472-478. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.07.004
- Hamblin, M. y Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3, 436-450. doi: 10.1039/b311900a
- Kocher, T., Langenbeck, M., Ruhling, A. y Plangmann, H. (2000). Subgingival polishing with a teflon-coated sonic scaler insert in comparison to conventional instruments as assessed in extracted teeth. *Journal of Clinical Periodontology*, 27, 243-249. doi: 10.1034/j.1600-051x.2000.027004243.x
- Komerik, N., Nakanishi, H., MacRobert, A., Henderson, B., Speight, P. y Wilson, M. (2003). In vivo killing of porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 47(3), 932-940. doi: 10.1128/aac.47.3.932-940.2003
- Konopka, K. y Goslinski, T. (2007). Photodynamic Therapy in Dentistry. *Journal of Dental Research*, 86(8), 694-707. doi: 10.1177/154405910708600803
- Kowaltowski, A., Turin, J., Indig, G. y Vercesi, D. (1999). Mitochondrial effects of thiarylmethane dyes. *Journal and Bioenergetics and Biomembranes*, 31(6), 581-590. doi: 10.1023/a:1005421112345

- Liébana, J. (2002). *Microbiología Oral*. Madrid, España: McGraw-Hill - Interamericana.
- López-Jiménez, L., Fusté, E., Martínez-Garriga, B., Arnabat-Domínguez, J., Vinuesa, T. y Viñas, M. (2015). Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Lasers in Medical Science*, 30, 1519-1526. doi: 10.1007/s10103-015-1749-y
- Martinez, M., Pastor, J. y Sendra, F. (1998). *Manual de Medicina Física*. Madrid, España: Harcourt Brace
- Nagata, J., Hioka, N., Kimura, E., Batistela, V., Terada, R., Graciano, A.,...Hayacibara, M. (2012). Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9, 122-131. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.11.006
- Núñez, S., Ribeiro, M. y Garcez, A. (2013). *PDT - Terapia Fotodinámica Antimicrobiana na Odontologia*. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier.
- Olivi, G. (2013). Laser use in endodontics: Evolution from direct laser irradiation to laser activated irrigation. *Journal of Laser Dentistry*, 21(2), 58-71. Recuperado de https://www.laser-eryag.com/wp-content/uploads/2016/10/Olivi_G_2013_J_Laser_Dent_13_58-71.pdf
- Pagonis, T., Chen, J., Fontana, C., Devalapally, H., Ruggiero, K., Song, X.,...Yamazaki, H. (2010). Nanoparticle-based Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Journal of Endodontics*, 36(2), 322-328. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.011
- Portenier, I., Waltimo, T. y Haasapalo M. (2003). *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. *Endodontic Topics*, 6, 135-159. doi: 10.1111/j.1601-1546.2003.00040.x

- Prates, R., Yamada, A., Suzuki, L., Eiko Hashimoto, M., Cai, S., Gouw-Soares, S.,...Ribeiro, M. (2007). Bactericidal effect of malachite Green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 86, 70-76. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2006.07.010
- Regan, J. y Parrish, J. (1982). *The Science of Photomedicine*. Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=YKXqBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Regan+JD,+Parrish+JA,+editors.+The+science+of+Photomedicine&ots=CRp8fQ4iCr&sig=YpLEbeW2zD4SYCmzBvDGguv8zWw#v=onepage&q=Regan%20JD%2C%20Parrish%20JA%2C%20editors.%20The%20science%20of%20Photomedicine&f=false>
- Ricucci, D., Siqueira, J., Bate, A. y PittFord, T. (2009). Histologic investigation of root canal-treated with apical periodontitis: A restrospective study from twenty-four patients. *Journal of Endodontics*, 35(4), 493-502. doi: 10.1016/j.joen.2008.12.014
- Salva, K. (2002). Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages, or indications. *Clinics in Dermatology*, 20, 571-581. doi: 10.1016/s0738-081x(02)00266-3
- Santezi, C., Reina, B. y Dovigo, L. (2018). Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections - A review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21, 409-415. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.016
- Sebrão, C., Bezerra, A., de França, P., Ferreira, L. y Westphalen, V. (2017). Comparison of the Efficiency of Rose Bengal and Methylene Blue as Photosensitizers in Photodynamic Therapy Techniques for *Enterococcus faecalis* Inactivation. *Photomedicine and Laser Surgery*, 35(1), 1-6. doi: 10.1089/pho.2015.3995
- Sena, N., Gomes, B., Vianna, M., Berber, V., Zaia, A., Ferraz, C. y Souza-Filho, F. (2006). In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected

- single-species biofilms. *International Endodontic Journal*, 39, 878-885. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01161.x
- Silva, E., Coutinho-Filho, W., Andrade, A., Herrera, D., Coutinho-Filho, T. y Krebs, R. (2014). Evaluation of photodynamic therapy using a diode laser and different photosensitizers against *Enterococcus faecalis*. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 27(2), 63-65.
- Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Emmanuel_Silva3/publication/269768612_Evaluation_of_photodynamic_therapy_using_a_diode_laser_and_different_photosensitizers_against_enterococcus_faecalis/links/550981d40cf2d7a2812cf3f7/Evaluation-of-photodynamic-therapy-using-a-diode-laser-and-different-photosensitizers-against-enterococcus-faecalis.pdf
- Soukos, N. y Goodson, J. (2011). Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology 2000*, 55, 143-166. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00346.x
- Souza, R., Junqueira, J., Rossoni, R., Pereira, C., Munin, E. y Jorge, A. (2009). Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers in Medical Science*, 25(3), 385-389. doi: 10.1007/s10103-009-0706-z
- Torabinejad, M., Walton, R. y Fouad, A. (2015). *Endodontics Principles and Practice*. Misuri, Estados Unidos: Elsevier.
- Trindade, A., De Figueiredo, J., Steier, L. y Weber, J. (2015). Photodynamic Therapy in Endodontics: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery*, 33(3), 175-182. doi: 10.1089/pho.2014.3776

- Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42, 13-28. doi: 10.1093/jac/42.1.13
- Wainwright, M., Phoenix, D., Marland, J., Wareing, D. y Bolton, F. (1997). A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 19, 75-80. doi: 10.1111/j.1574-695x.1997.tb01074.x
- Walsh, L. (2003). The current status of laser applications in dentistry. *Australian Dental Journal*, 48(3), 146-155. doi: 10.1111/j.1834-7819.2003.tb00025.x
- Wilson, M. (2004). Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochemical and Photobiological sciences*, 3, 412-418. doi: 10.1039/b211266c

IX. Anexos

Anexo 1. Ficha de recolección de datos

GRUPO LS+AM (Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno)	MUESTRAS	UFC (10 μ l)	UFC/ml
	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
	9		
10			

GRUPO LS+VM (Irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita)	MUESTRAS	UFC (10 μ l)	UFC/ml
	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
	9		
10			

GRUPO CONTROL (Sin tratamiento)	MUESTRAS	UFC (10 μ l)	UFC/ml
	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
	9		
10			

Anexo 2. Carta de presentación dirigida al Hospital Nacional Hipólito Unanue



Universidad Nacional
Federico Villarreal

"AÑO DE LA LUCHA CONTRA AL CORRUPCIÓN Y LA IMPUNIDAD"

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS

Pueblo Libre, 21 de junio de 2019

Doctor
LUIS MIRANDA MOLINA
DIRECTOR GENERAL
HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE
Presente .-

De mi especial consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a usted, con la finalidad de presentarle al Bachiller **TORRES PÁRRAGA FRANZ LUIS**, quien se encuentra realizando su trabajo de tesis titulada:

ANÁLISIS IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA USANDO DOS FOTOSENSIBILIZADORES Y UN LÁSER DE 660 nm FRENTE AL *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para renovarle los sentimientos de mi especial consideración.

Atentamente,



Mg. MARTÍN GLICERIO ANAÑOS GUEVARA
DECANO

Se adjunta: Protocolo de Tesis

011-2019

CRHP/LVB

Mg. CARMEN ROSA HUAMANI PARRA
JEFE (e)
OFICINA DE GRADOS y TÍTULOS

Anexo 3. Carta de aprobación del proyecto de tesis del Hospital Nacional Hipólito Unanue



PERÚ	Ministerio de Salud	Hospital Nacional "Hipólito Unanue"	Comité Institucional de Ética en Investigación
------	------------------------	--	---

"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad "

CARTA N° 210 – 2019 - CIEI-HNHU

A : FRANZ LUIS TORRES PÁRRAGA
 ASUNTO : Aprobación de Proyecto de tesis
 Referencia : Expediente N° 28804
 FECHA : El Agustino, 12 de diciembre del 2019

Es grato dirigirme a usted, para saludarle cordialmente y dar respuesta al documento de referencia donde solicita revisión y aprobación del Proyecto de tesis titulado: "**Análisis in vitro del efecto antibacteriano de la terapia fotodinámica usando dos fotosensibilizadores y un láser de 660 nm frente al enterococcus faecalis atcc 29212**", para optar el título profesional de Cirujano Dentista - UNFV.

El Comité, en sesión ordinaria de fecha miércoles 11 de diciembre del presente, y según consta en el Libro de actas N° 7, Acordó por unanimidad aprobar el proyecto de tesis antes mencionado.

Atentamente,

MINISTERIO DE SALUD
 HOSPITAL NACIONAL HIPOLITO UNANUE
 DRA. ANGELICA RICCI YAUZILCA
 C.M.P. 6452
 Presidenta del Comité de Ética en Investigación.

ARY
 archivo

Avenida César Vallejo N° 1390 - distrito El Agustino - Lima - Perú
 Correo electrónico : ciei@hnhu.gob.pe - angelicaricci05@yahoo.es Teléfono: 2919092 , 3627777 anexo 2196

Anexo 4. Carta de presentación dirigida a la Clínica de Endodoncia



Universidad Nacional
Federico Villarreal

FACULTAD DE
ODONTOLOGIA

CARGO

"Año de la Lucha Contra la Corrupción y la Impunidad"

DEPARTAMENTO ACADÉMICO

Pueblo Libre, 16 de agosto de 2019.

OFICIO N° 216-2019- DA-FO-UNEV

CD.
MAUEL CANASSA TORRES
Responsable del Taller Clínica de Endodoncia
Presente. -

ASUNTO: Autorización para la recopilación de datos en el
Taller Clínica de Endodoncia
REFERENCIA: carta s/n de Grados y Títulos (12-08-2019)

Es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente, y en atención al documento de la referencia, el Bachiller: **TORRES PARRAGA FRANZ LUIS**, quien se encuentra realizando su trabajo de tesis titulado:

"ANÁLISIS IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA USANDO DOS FOTOSENSIBILIZADORES Y UN LÁSER DE 660 nm FRENTE AL *Enterococcus faecalis* ATCC 29212"

En tal virtud, mucho agradeceré le brinde las facilidades del caso al Bachiller Torres, para la realización de su trabajo, el cual estará bajo la supervisión del Esp. Luis Coffo Geldres.

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente,


Mg. C.D. **ELOY MENDOZA GARCIA**
Director (e)
Departamento Académico

Se adjunta Plan de Tesis


CD. **MAUEL CANASSA TORRES**
Endodoncia
COP 8445 RNE 2136

Anexo 5. Ficha técnica del Equipo Láser modelo Therapy XT (DMC)

Indicaciones Clínicas



PDT (Terapia Fotodinámica)

0,005%

Indicación de uso para áreas profundas

- Endodancia
- Lesiones periapicales - Apicectomías
- Bolsas periodontales profundas
- Defectos óseos contaminados

0,01%

Indicación de uso para áreas superficiales

- Lesiones bucales contaminadas
- Periimplantitis
- Herpes Simple
- Descontaminación en superficies dentales - Caries



Anexo 6. Ficha técnica del Fotosensibilizador Azul de metileno Chimiolux 5 (DMC)

Protocolo de Aplicación

PDT (Terapia Fotodinámica) 



 <p>1 Inserción de solución de azul de metileno al 0,005%</p>	 <p>2 Espera de 5 minutos: tiempo de pre-irradiación</p>
 <p>3 Irradiación con LÁSER ROJO*</p>	 <p>4 Remoción del agente sensibilizante</p>

***Irradiación con LÁSER ROJO**

<ul style="list-style-type: none"> • Longitud de onda: 660nm • Dosis: 320J/cm² y Energía: 9J 	<ul style="list-style-type: none"> • Potencia: 100mW • Tiempo de Irradiación: 90s
---	---





Anexo 7. Ficha técnica del Verde de Malaquita

HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.
Certified ISO 9001-2008 and WHO GMP

HIMEDIA
23, Vaidhanti Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086
Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis

Material Name: Malachite green oxalate, Practical grade
CAS Number : 2437-29-8
Material Code : GRM952
Lot Number : 0000373121

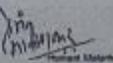
TEST	SPECIFICATIONS	RESULTS
Appearance	Green to dark green to metallic green crystals or powder	Green crystals with metallic luster
Solubility	2 ppm in water yields dark blue to dark green clear solution	Complies
Absorption maxima	614nm - 620nm	617.3nm
Loss on drying (at 110°C, 1 hr)	<= 5%	2.01%

STATUS : APPROVED

QC Release Date : 2019-01-22
 Expiry Date : 2023-01-31


 Anuja Paul
 Quality Control Chemist
 Chemical Division


 P. R. Shetty
 Manager, Quality Control
 Chemical Division


 Pankaj Malhotra
 Manager, Quality Assurance
 Chemical Division

This is to certify that this lot passes and it conforms to the above mentioned tests and specifications. The information given here is believed to be correct and accurate, however, both the information and products are offered without warranty for any particulars use, other than that specified in the current technical data.

This document has been produced electronically and is valid with out signature.

PAGE : 1 of 1

Anexo 8. Consentimiento informado**HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE****SERVICIO DE ORTODONCIA Y ORTOPEDIA MAXILAR**

NOMBRE DEL PACIENTE:

NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL DEL PACIENTE:

CALIDAD DEL REPRESENTANTE LEGAL:

FECHA:

CIUDAD:

Yo, _____ identificado (a) como aparece al pie de mi firma, por medio del presente documento, en nombre propio o en mi calidad del representante legal del paciente en pleno y normal uso de mis facultades mentales se me ha explicado los motivos por los cuales deben extraerme un determinado número de piezas dentarias como parte de mi tratamiento de Ortodoncia, por ello otorgo en forma libre mi consentimiento al odontólogo de la especialidad de Ortodoncia y Ortopedia maxilar y al Bachiller Franz Luis Torres Párraga, donar pieza dentaria con motivos de estudio e investigación y para los fines que considere pertinente.

FIRMA DEL PACIENTE

(Representante legal, mayor de edad)

FIRMA DE BACHILLER

FIRMA DEL ODONTÓLOGO

Anexo 9. Lista de imágenes



Imagen 1: Recolección de premolares monorradiculares permanentes recientemente extraídas.



Imagen 2: Muestra conservada en suero fisiológico a temperatura ambiente, hasta su posterior uso.



Imagen 3: Pieza dentaria preparada para ser radiografiada (vista frontal).



Imagen 4: Pieza dentaria preparada para ser radiografiada (vista proximal).

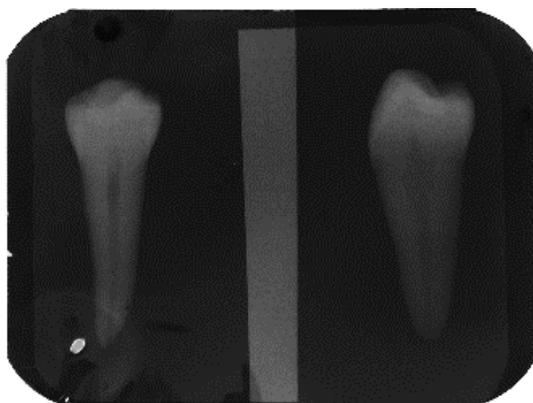


Imagen 5: Pieza dentaria radiografiada (vistas frontal y proximal).



Imagen 6: Disco diamantado de corte y mandril.



Imagen 7: Determinación y marcado de la longitud radicular a trabajar.



Imagen 8: Micromotor de mano.

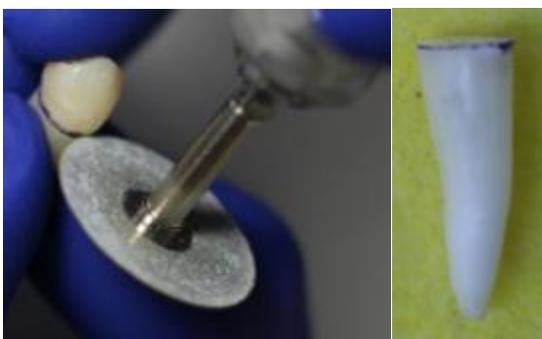


Imagen 9: Decoronación de la pieza dentaria y determinación de la longitud de la raíz (15 mm).



Imagen 10: Permeabilización del conducto radicular y determinación de la longitud de trabajo (1 mm antes del foramen apical) con una lima manual tipo K n° 10.



Imagen 11: Motor endodóntico rotatorio X-Smart.



Imagen 12: Sistema de limas rotatorias Protaper Next (X₁, X₂ y X₃).



Imagen 13: Juego de limas endodónticas; Lima manual tipo K n° 10, Lima rotatoria Proglider, Limas rotatorias del sistema Protaper Next X₁, X₂ y X₃.

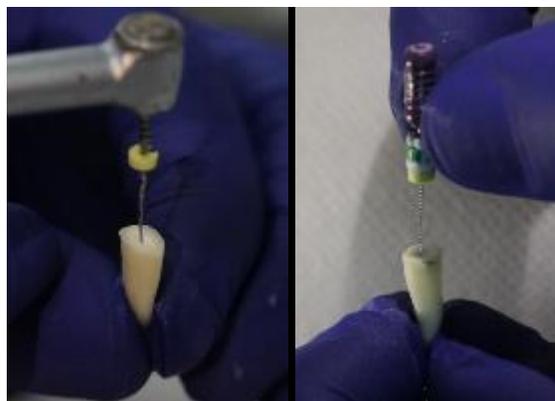


Imagen 14: Preparación del Glide Path del conducto radicular con lima rotatoria Proglider y recapitulación manual con lima tipo K n° 10.

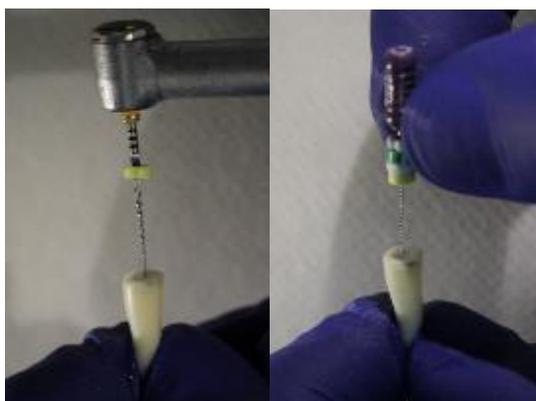


Imagen 15: Preparación del conducto radicular con lima rotatoria X₁ y recapitulación manual con lima tipo K n° 10.

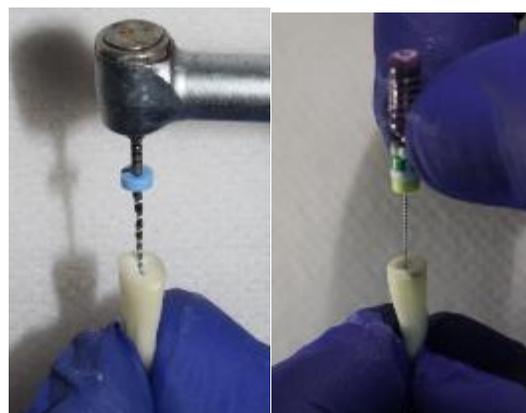


Imagen 16: Preparación del conducto radicular con lima rotatoria X₂ y recapitulación manual con lima tipo K n° 10.

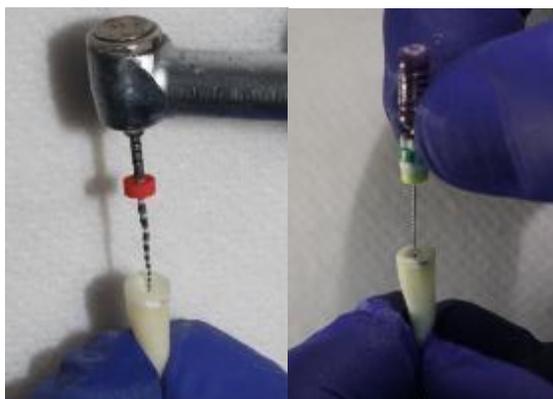


Imagen 17: Preparación del conducto radicular con lima rotatoria X₁ y recapitulación manual con lima tipo K n° 10.



Imagen 18: Irrigación del conducto radicular con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 4% (2 ml en cada irrigación).



Imagen 19: Irrigación del conducto radicular con EDTA (3 ml) al 17%.



Imagen 20: Irrigación del conducto radicular con suero fisiológico (5 ml) al 0,9%.

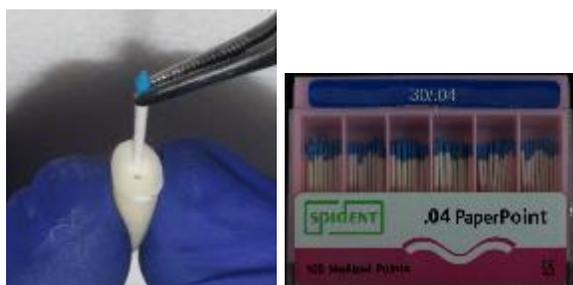


Imagen 21: Secado del conducto radicular con conos de papel 30.04.



Imagen 22: Conducto radicular preparado.



Imagen 23: Raíz fijada en bloque de silicona y colocada verticalmente en un tubo criovial.



Imagen 24: Colocación de la muestra en una caja autoclavable para su posterior esterilización.



Imagen 25: Mechero utilizado para proporcionar un área de esterilidad al campo de trabajo en el laboratorio de Microbiología.



Imagen 26: Cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.



Imagen 27: Cultivo de *Enterococcus faecalis* en Agar Sangre con TSA.



Imagen 28: Turbidímetro.



Imagen 29: Hisopado del cultivo de *Enterococcus faecalis*.



Imagen 30: Suspensión de *Enterococcus faecalis* en solución salina.



Imagen 31: Caldo cerebro corazón (BHI) y suspensión de *Enterococcus faecalis* en BHI.



Imagen 32: Retiro de la suspensión de *Enterococcus faecalis* con una jeringa de tuberculina para posterior inoculación.



Imagen 33: Primera inoculación de la suspensión de *Enterococcus faecalis* con una aguja Navitip 30G de 17 mm (nótese el sobrepase apical) y secado del ápice radicular con una gasa estéril.



Imagen 34: Aplicación de resina en la región apical y fotopolimerizado por 20 segundos para sellado apical.



Imagen 35: Ápice radicular sellado.



Imagen 36: Segunda inoculación de la suspensión de *Enterococcus faecalis* con una aguja Navitip 30G de 17 mm (nótese el llenado del conducto radicular).



Imagen 38: Mechero utilizado para proporcionar un área de esterilidad al campo de trabajo en la clínica de Endodoncia.



Imagen 40: Eliminación del exceso del medio de cultivo (BHI) mediante irrigación con suero fisiológico (2 ml) y succión.

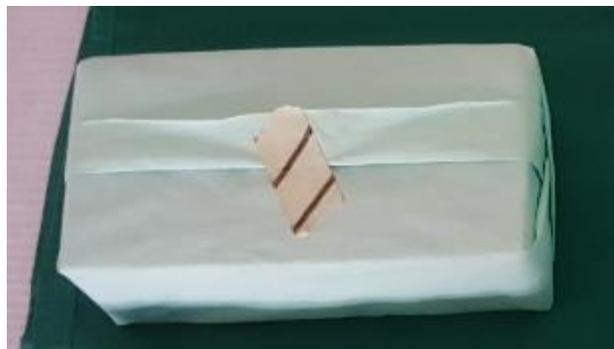


Imagen 37: Inoculación completa de las muestras y listas para la incubación (por 21 días a 37°C).



Imagen 39: Fotosensibilizador azul de metileno al 0,005%.

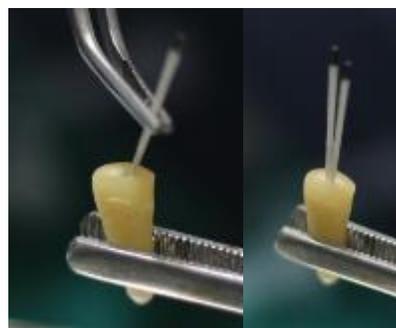


Imagen 41: Secado del conducto radicular con conos de papel estériles 30.04.



Imagen 42: Preparación de las muestras del grupo control; Sin tratamiento, solo irrigación con suero fisiológico en el conducto radicular a longitud de trabajo (14 mm).



Imagen 43: Preparación de las muestras del grupo LS+AM; Terapia fotodinámica, aplicación del fotosensibilizador azul de metileno al 0,005% en el conducto radicular (preirradiación por 5 min).



Imagen 44: Preparación del verde de malaquita al 0,005%.

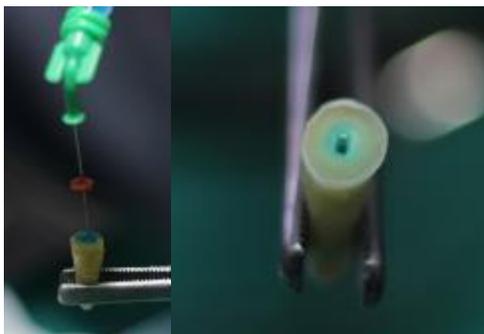


Imagen 46: Preparación de las muestras del grupo LS+VM; Terapia fotodinámica, aplicación del fotosensibilizador verde de malaquita al 0,005% en el conducto radicular (preirradiación por 5 min).



Imagen 45: Fotosensibilizador verde de malaquita al 0,005%.



Imagen 47: Láser Therapy XT (longitud de onda 660 nm, potencia 100 Mw, dosis 320 J/cm² y 9J de energía) y lentes protectores.



Imagen 48: Instalación de un Tip de 200 μm de diámetro en la punta del equipo láser para posterior irradiación.

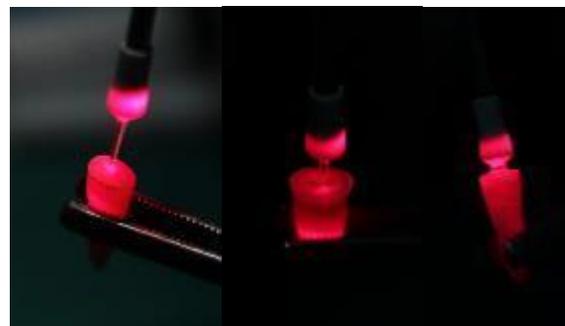


Imagen 49: Irradiación láser con movimientos en espiral desde la cervical hasta apical del conducto radicular durante 90 segundos.

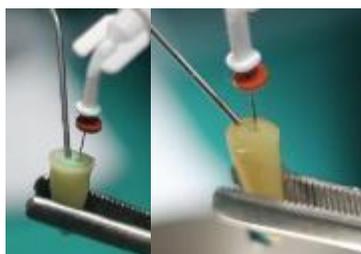


Imagen 50: Eliminación del excedente de fotosensibilizador mediante irrigación de suero fisiológico (5 ml).

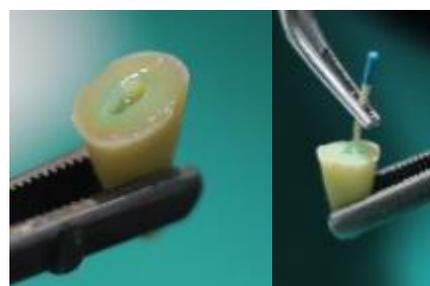


Imagen 51: Toma de la muestra de *Enterococcus faecalis*; Recolección de la muestra con un cono de papel 30.04.



Imagen 52: Colocación de la muestra en tubo microvial para cultivo posterior.



Imagen 53: Colocación del criovial en un cooler para conservar la muestra en una temperatura estable para posterior transporte al laboratorio.

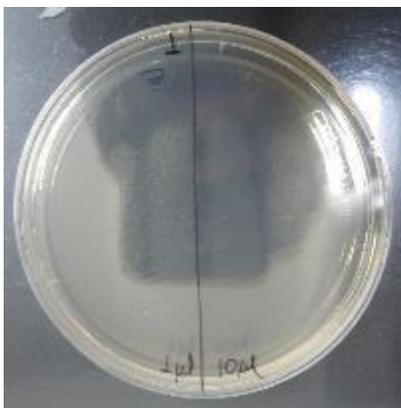


Imagen 54: Agar Enterococcosel (Agar selectivo para *Enterococcus*).



Imagen 55: Colocación de solución fisiológica en el tubo criobial para recolección de una muestra de *Enterococcus faecalis* en forma de una solución líquida.



Imagen 56: Recolección de 10 μ l de la muestra de *Enterococcus faecalis* para cultivo en Agar selectivo para *Enterococcus*.



Imagen 57: Incubación de las muestras de *Enterococcus faecalis* por 48 horas.



Imagen 58: Conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) de las muestras del grupo LS+AM a las 48 horas.



Imagen 59: Conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) de las muestras del LS+VM a las 48 horas.

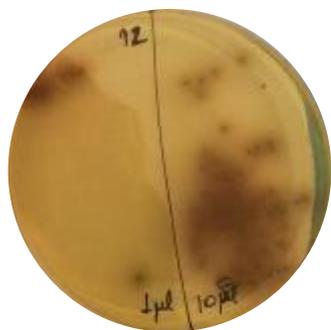


Imagen 60: Conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) de las muestras del GRUPO CONTROL a las 48 horas.

Anexo 10. Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Dimensión	Indicadores	Escala de medición	Metodología
¿Cuál es el efecto antibacteriano del láser rojo usando diferentes fotosensibilizadores como el azul de metileno y el verde de malaquita en premolares humanos monorradiculares contaminados con <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212?	<p>Objetivo general</p> <p>Evaluar el efecto antibacteriano del láser rojo usando diferentes fotosensibilizadores como el azul de metileno y el verde de malaquita en premolares humanos monorradiculares contaminados con <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>Determinar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de <i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212 con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005% en premolares monorradiculares humanos.</p> <p>Determinar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de <i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212 con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005% en premolares monorradiculares humanos.</p> <p>Determinar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de <i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212 sin irradiación del láser rojo asociado a un fotosensibilizador en premolares monorradiculares humanos.</p> <p>Comparar el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de <i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212 con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador azul de metileno al 0.005%, con irradiación del láser rojo asociado al fotosensibilizador verde de malaquita al 0.005% y sin irradiación del láser rojo asociado a un fotosensibilizador en premolares monorradiculares humanos.</p>	Es probable que se encuentren diferencias en el efecto antibacteriano del láser rojo usando el fotosensibilizador azul de metileno y el fotosensibilizador verde de malaquita en premolares contaminados con <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.	<p>Variable dependiente</p> <p>Efecto antibacteriano</p> <p>Variable independiente</p> <p>Fotosensibilizadores (azul de metileno y verde de malaquita)</p>	Crecimiento bacteriano	Unidad formadora de colonias	Razón	<p>Tipo de estudio</p> <p>Experimental, prospectivo, transversal y comparativo</p> <p>Población</p> <p>Premolares humanos monorradiculares</p> <p>Muestra</p> <p>10 premolares humanos monorradiculares</p> <p>Método</p> <p>Observación directa</p> <p>Instrumento</p> <p>Ficha de recolección de datos</p>