



Estudio comparativo *in vitro* de la capacidad antibacteriana de la clorhexidina, hidróxido de calcio y yoduro de potasio yodado contra *Fusobacterium nucleatum*

Verónica Calderón Castillo,* Laurie Ann Ximénez Fyvie,§ Enrique Chávez Bolado^{||}

RESUMEN

Introducción: El tratamiento endodóncico tiene como uno de sus principales objetivos la eliminación de la microflora del sistema de conductos radiculares. Esto se logra mediante la limpieza, desinfección y conformación de dicho sistema mediante la instrumentación, irrigación y utilización de medicación intraconducto. **Objetivo:** Comparar la capacidad para inhibir el crecimiento de *Fusobacterium nucleatum* con la utilización de tres medicamentos intraconducto: clorhexidina (CHX), hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) y yoduro de potasio yodado (IKI) utilizados individualmente y en diferentes combinaciones. **Metodología:** *F. nucleatum* subespecie *nucleatum* fue sembrado en placas de agar. Discos de papel filtro fueron embebidos en cada medicamento y colocados sobre la superficie del agar. Las placas fueron incubadas en una cámara de anaerobiosis durante 7 días. Se efectuó el registro en milímetros de los radios de las zonas de inhibición del crecimiento. **Resultados:** La capacidad antimicrobiana fue mayor para CHX, seguida por IKI y Ca(OH)₂. La CHX al 2% inhibió significativamente mejor el crecimiento bacteriano que el IKI al 4% + 2% ($p < 0.05$). La CHX al 2% mostró una capacidad antimicrobiana significativamente mayor que cualquiera de las concentraciones de Ca(OH)₂. Ninguna de las combinaciones de medicamentos intraconducto, mostraron capacidad antimicrobiana superior a la de CHX al 4% y 2% individualmente. **Conclusiones:** La CHX al 4%, 2% y 1% de manera individual, presentó una actividad antimicrobiana elevada, seguida por el IKI con una actividad moderada y el Ca(OH)₂ que presentó una escasa capacidad para inhibir el crecimiento de *F. nucleatum*. La combinación de medicamentos intraconducto no potenció los efectos antimicrobianos de los medicamentos evaluados.

Palabras clave: Medicamentos intraconducto, *Fusobacterium nucleatum*, clorhexidina, hidróxido de calcio, yoduro de potasio yodado.
Key words: Intracanal medicaments, *Fusobacterium nucleatum*, chlorhexidine, calcium hydroxide, iodine potassium iodide.

INTRODUCCIÓN

La pulpa dental y los tejidos periapicales tienen la capacidad de reaccionar ante una gran diversidad de irritantes. Las bacterias que invaden el espacio pulpar son uno de los principales irritantes, causando inflamación de este tejido, que al persistir puede resultar en la necrosis del mismo. Dicha destrucción tisular permite que las bacterias, sus productos y otros irritantes alojados en el tejido necrótico se difundan des-

ABSTRACT

Introduction: One of the primary objectives of root canal therapy is the removal of microbial species within the canal system. Such goal is accomplished by cleansing, disinfecting and shaping of the canals through mechanical instrumentation, irrigation and the use of intracanal medicaments. **Purpose:** To compare the effectiveness in inhibiting the growth of *Fusobacterium nucleatum* of 3 intracanal medicaments: chlorhexidine (CHX), calcium hydroxide (Ca(OH)₂) and iodine potassium iodide (IKI) used individually and in various combinations. **Methods:** *F. nucleatum* subspecies *nucleatum* was grown on agar plates. Paper filter disks were immersed in each medicament and placed on the agar surface. Plates were incubated in an anaerobic chamber for 7 days. The radius of growth-inhibition zones was recorded in millimeters. **Results:** Antimicrobial effect was greater for CHX, followed by IKI and Ca(OH)₂. 2% CHX inhibited significantly better the bacterial growth than 4% + 2% IKI ($p < 0.05$). Two percent CHX also exhibited a significantly greater antimicrobial effect than either of the concentrations of Ca(OH)₂ tested. None of the combinations of medicaments exhibited a greater antimicrobial effect than 4% and 2% CHX tested individually. **Conclusions:** 4%, 2% and 1% CHX individually, exhibited the greatest antimicrobial effect followed by IKI with a moderate effect and Ca(OH)₂ which exhibited only a discrete antimicrobial activity against *F. nucleatum*. The combination of intracanal medicaments did not increase the antimicrobial effects of the medicaments evaluated individually.

* Alumna de la Especialidad de Endodoncia.

§ Jefe del Laboratorio de Genética Molecular.

^{||} Coordinador de la Especialidad de Endodoncia.

de el conducto hacia el periápice, produciendo una lesión inflamatoria en dicha región.¹ Por lo tanto, las especies bacterianas son esenciales en la progresión y perpetuación de las lesiones pulpares y periapicales.² La reparación del tejido periapical se logra sólo con la eliminación de los irritantes dentro del sistema de conductos radiculares y su posterior obturación total.³ La mayoría de las especies bacterianas aisladas de infecciones endodóncicas son anaerobias estrictas. Una de las que destacan con una prevalencia reportada mayor al 48% en infecciones endodóncicas es *Fusobacterium nucleatum*.⁴ Siendo dicha especie una bacteria Gram negativa, su pared celular contiene lipopolisacáridos que son su principal factor de virulencia contribuyendo en la patogenia de la periodontitis apical y el desarrollo de abscesos periapicales.⁵⁻⁷

El tratamiento endodóncico tiene como objetivo primordial la eliminación de la microflora y restos necróticos del sistema de conductos radiculares, lo cual se lleva a cabo mediante la limpieza, desinfección y conformación de dicho sistema. La limpieza se logra generalmente con la instrumentación, irrigación y utilización de medicación intraconducto.⁸ Algunos de los medicamentos intraconducto frecuentemente empleados son la clorhexidina (CHX), el hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) y el yoduro de potasio yodado (IKI). La CHX es un antiséptico catiónico bisguanídico con acción antimicrobiana que en bajas concentraciones es bacteriostático y en altas concentraciones tiene acción bactericida.^{9,10} Su mecanismo de acción se basa en la absorción del medicamento a través de la pared celular de la bacteria, provocando el rompimiento en los enlaces peptídicos en la membrana citoplasmática, así como la precipitación y/o coagulación del citoplasma.¹¹ Se ha demostrado que la CHX presenta baja toxicidad en los tejidos periapicales cuando es empleada como medicación intraconducto en concentraciones de 0.12 a 2%.¹² Algunos estudios han sugerido que la mayor actividad antimicrobiana de la CHX se obtiene a las 48 ó 72 horas cuando se utiliza al 2%.^{10,13-18}

El Ca(OH)_2 es un medicamento intraconducto que posee un pH alcalino de aproximadamente 12.5, lo cual le confiere actividad bactericida¹⁹ mediante la liberación de iones hidroxilo que se introducen en la membrana citoplasmática bacteriana²⁰ provocando hidrólisis de moléculas e inhibiendo actividades enzimáticas bacterianas.²¹⁻²⁴ Así mismo, el Ca(OH)_2 posee capacidad para disolver el tejido pulpar¹⁹ y para activar a la fosfatasa alcalina para la iniciación del proceso de mineralización.⁸ El IKI es un agente antimicrobiano que al ser empleado como medicación intraconducto, posee un bajo nivel de citotoxicidad en los tejidos pe-

riapicales.^{25,26} Algunos estudios han reportado que el IKI puede ser un antimicrobiano más potente que el hipoclorito de sodio y la clorhexidina.^{27,28} La mayoría de los estudios han sugerido la utilización de estos medicamentos como medicación única, sin embargo, se ha reportado que puede existir una potenciación de la actividad antimicrobiana de dichos medicamentos al combinarlos.^{12,29}

El objetivo del presente estudio fue comparar la capacidad para inhibir el crecimiento *in vitro* de *F. nucleatum* con la utilización de diversas concentraciones de tres medicamentos intraconducto: clorhexidina, hidróxido de calcio y yoduro de potasio yodado utilizados individualmente y en diferentes combinaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se realizó un estudio en donde se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes concentraciones de tres medicamentos intraconducto, para inhibir el crecimiento de *F. nucleatum*. La CHX, el Ca(OH)_2 y el IKI fueron utilizados de manera individual y en diferentes combinaciones. En el *cuadro I* se presenta una síntesis de las concentraciones y combinaciones de medicamentos que fueron empleados.

Evaluación microbiológica

Se utilizó la cepa de referencia del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) No. 25585 de *F. nucleatum* subespecie *nucleatum*. La cepa se sembró en placas de agar enriquecido [agar base para *Mycoplasma* (Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL, Sparks, MD, USA) suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab S.A. de C.V., México, D.F.), 0.3 µg/mL de menadiona (vitamina K, Sigma Aldrich Química, S.A. de C.V.; Toluca, México) y 5 µg/mL de hemina (Sigma)] y se creció dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2 a 35 °C. El crecimiento sobre la superficie del agar fue recolectado con hisopos estériles y se transfirió por duplicado en placas de agar enriquecido con sembrado en césped. Se emplearon discos de papel filtro Whatman de 6 mm de diámetro, los cuales fueron embebidos en cada concentración y combinación de los medicamentos evaluados (*Cuadro I*). Como control negativo se emplearon discos embebidos en agua destilada. Todas las placas fueron incubadas en una cámara de anaerobiosis a 35 °C durante 7 días. Posteriormente, se efectuó el registro en milímetros por triplicado de los radios de las zonas

de inhibición del crecimiento de *F. nucleatum* mediante la inspección visual de cada placa (Figura 1).

Análisis estadístico

Las tres mediciones de cada zona de inhibición fueron promediadas. Posteriormente, se calculó una media y desviación estándar (DE) del duplicado para cada una de las concentraciones de los medicamentos y sus combinaciones evaluadas. Las diferencias entre concentraciones, medicamentos y combinaciones fueron determinadas para cada par de observaciones mediante la prueba *t* de Student.

RESULTADOS

La figura 2 resume los resultados de la inhibición promedio del crecimiento de *F. nucleatum* (mm ± DE) en presencia de diferentes concentraciones de CHX, Ca(OH)₂ e IKI. En términos generales, la capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano de los medicamentos in-

traconduco evaluados fue mayor para CHX, seguido por IKI y Ca(OH)₂, en orden decreciente. La CHX al 4% mostró significativamente mayor capacidad para inhibir el crecimiento de *F. nucleatum* que la CHX al 0.12% ($p < 0.05$); el IKI en todas las concentraciones evaluadas exceptuando al 1% + 0.5% (8% + 4% $p < 0.05$, 4% + 2% $p < 0.05$ y 2% + 1% $p < 0.01$) y el Ca(OH)₂ en las tres concentraciones analizadas (0.17 g/mL $p < 0.001$, 0.35 g/mL $p < 0.01$ y 0.7 g/mL $p < 0.01$). La CHX en una de las concentraciones clínicas comúnmente empleadas (2%) inhibió significativamente mejor el crecimiento bacteriano que el IKI evaluado también a su concentración clínica (4% + 2% $p < 0.05$). La CHX y el IKI en todas las concentraciones evaluadas, excepto CHX al 1% y IKI al 4% + 2%, inhibieron el crecimiento bacteriano significativamente mejor que el Ca(OH)₂ a 0.7 g/mL. Asimismo, cualquiera de las concentraciones evaluadas de CHX exceptuando al 1% y 0.06% mostraron una capacidad de inhibición del crecimiento de *F. nucleatum* significativamente mayor que cualquiera de las concentraciones evaluadas de Ca(OH)₂.

Cuadro I. Concentración de medicamentos evaluados.

CHX* (%)	Ca(OH) ₂ [§] (g/mL)	IKI (% KI + % I ₂)	Combinaciones de medicamentos en concentraciones clínicas
0.06	0.17	1 + 0.5	CHX (0.12%) + IKI
0.12 [¶]	0.35	2 + 1	CHX (0.12%) + Ca(OH) ₂
0.25	0.7 [¶]	4 + 2 [¶]	CHX (0.12%) + IKI + Ca(OH) ₂
0.5		8 + 4	CHX (2%) + IKI
1			CHX (2%) + Ca(OH) ₂
2 [¶]			CHX (2%) + IKI + Ca(OH) ₂
4			IKI + Ca(OH) ₂

*Clorhexidina. [§]Hidróxido de calcio en agua destilada. ^{||}Yoduro de potasio yodado (KI: yoduro de potasio, I₂: yodo). [¶]Concentraciones comúnmente empleadas en la práctica clínica.

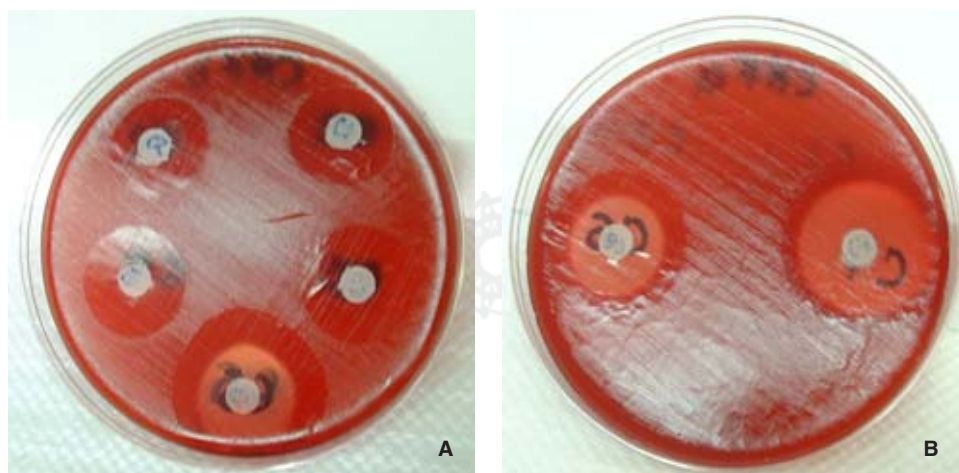


Figura 1. Imágenes de placas con agar enriquecido en las que se observa el crecimiento en césped de *Fusobacterium nucleatum* ss *nucleatum* (ATCC 25585) así como la presencia de zonas variables de inhibición del crecimiento bacteriano en las áreas que circundan los discos de papel embebidos en 0.06%, 0.12%, 0.25%, 0.5%, 1% (a), 2% y 4% (b) de clorhexidina.

En la *figura 3* se presentan los resultados de la inhibición promedio del crecimiento de *F. nucleatum* (mm ± DE) en presencia de diferentes combinaciones de los 3 medicamentos intraconducto en sus concentraciones clínicas. Se determinó que la combinación de la CHX al 2% y el IKI al 4% + 2%, resultó en una mejor inhibición del crecimiento de *F. nucleatum* al ser comparado con las combinaciones de IKI al 4% + 2% y Ca(OH)₂ al 0.7 g/mL (p < 0.05) y de CHX al 0.12% y Ca(OH)₂ al 0.7 g/mL (p < 0.05). Asimismo, la combinación de CHX al 2%, IKI al 4% + 2% y Ca(OH)₂ al 0.7 g/mL presentó una mejor inhibición del crecimiento de la bacteria en comparación con las combinaciones de CHX al 2% y Ca(OH)₂ al 0.7 g/mL (p < 0.01), CHX al 0.12% junto con IKI al 4% + 2% (p < 0.05) y IKI al 4% + 2% y Ca(OH)₂ al 0.7 g/mL (p < 0.001). Cabe señalar que ninguna de las combinaciones de medicamentos intraconducto evaluadas, mostraron una capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano superior a la CHX al 4% y 2% en evaluaciones individuales.

La *figura 4* resume los resultados de la inhibición promedio del crecimiento de *F. nucleatum* (mm ± DE)

en presencia de las concentraciones comúnmente empleadas en la práctica clínica de los medicamentos evaluados, tanto individualmente como en combinaciones. El crecimiento bacteriano fue inhibido significativamente mejor con la CHX al 2% en comparación a las combinaciones de CHX al 0.12% con Ca(OH)₂ (p < 0.001) y CHX al 0.12% en combinación con Ca(OH)₂ y IKI (p < 0.05). Asimismo, la CHX al 2% en combinación con IKI (p < 0.05), Ca(OH)₂ (p < 0.05) y con ambos (IKI y Ca(OH)₂, p < 0.01) inhibió el crecimiento de *F. nucleatum* significativamente más que el Ca(OH)₂.

DISCUSIÓN

La limpieza biomecánica y la conformación del sistema de conductos radiculares junto con la medicación intraconducto son esenciales para la eliminación de la microflora endodóncica presente en sistemas de conductos radiculares contaminados para así aumentar las probabilidades de éxito en la terapia de conductos.^{2,30} Se ha demostrado en diversos estudios que *F. nucleatum* es una bacteria que se encuentra frecuentemente en la microflora de lesiones pulpoperiapicales.^{4,5,7} La

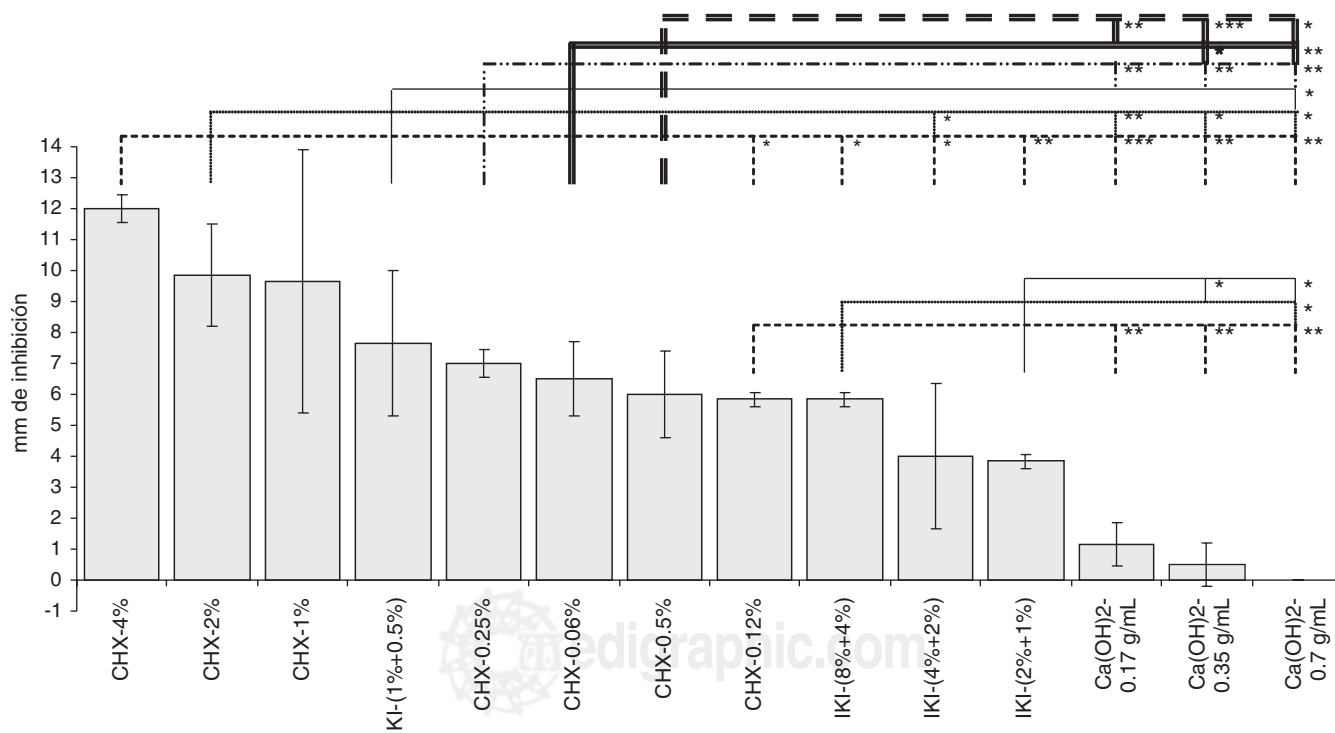


Figura 2. Inhibición promedio (mm ± DE) del crecimiento de *Fusobacterium nucleatum* ss *nucleatum* (ATCC 25585) en presencia de diferentes concentraciones de 3 medicamentos intraconducto. Tres mediciones de cada zona de inhibición fueron registradas y promediadas para cada duplicado. Posteriormente se calculó una media entre duplicados. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 prueba t de Student.

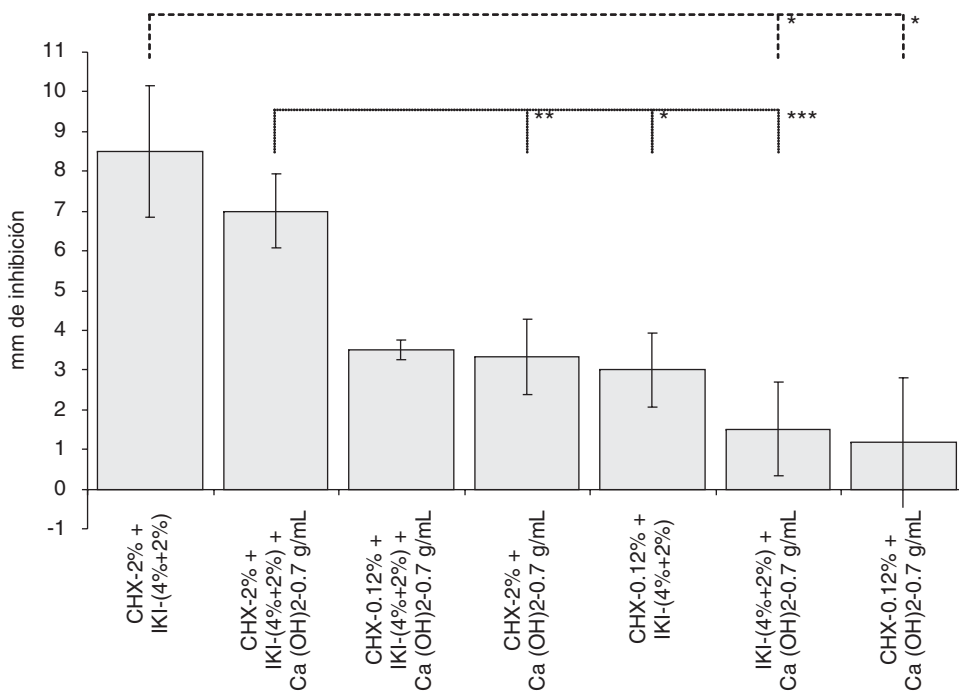


Figura 3. Inhibición promedio (mm ± DE) del crecimiento de *Fusobacterium nucleatum ss nucleatum* (ATCC 25585) en presencia de diferentes combinaciones de 3 medicamentos intraconducto en concentraciones clínicas. Tres mediciones de cada zona de inhibición fueron registradas y promediadas para cada duplicado. Posteriormente se calculó una media entre duplicados. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 prueba t de Student.

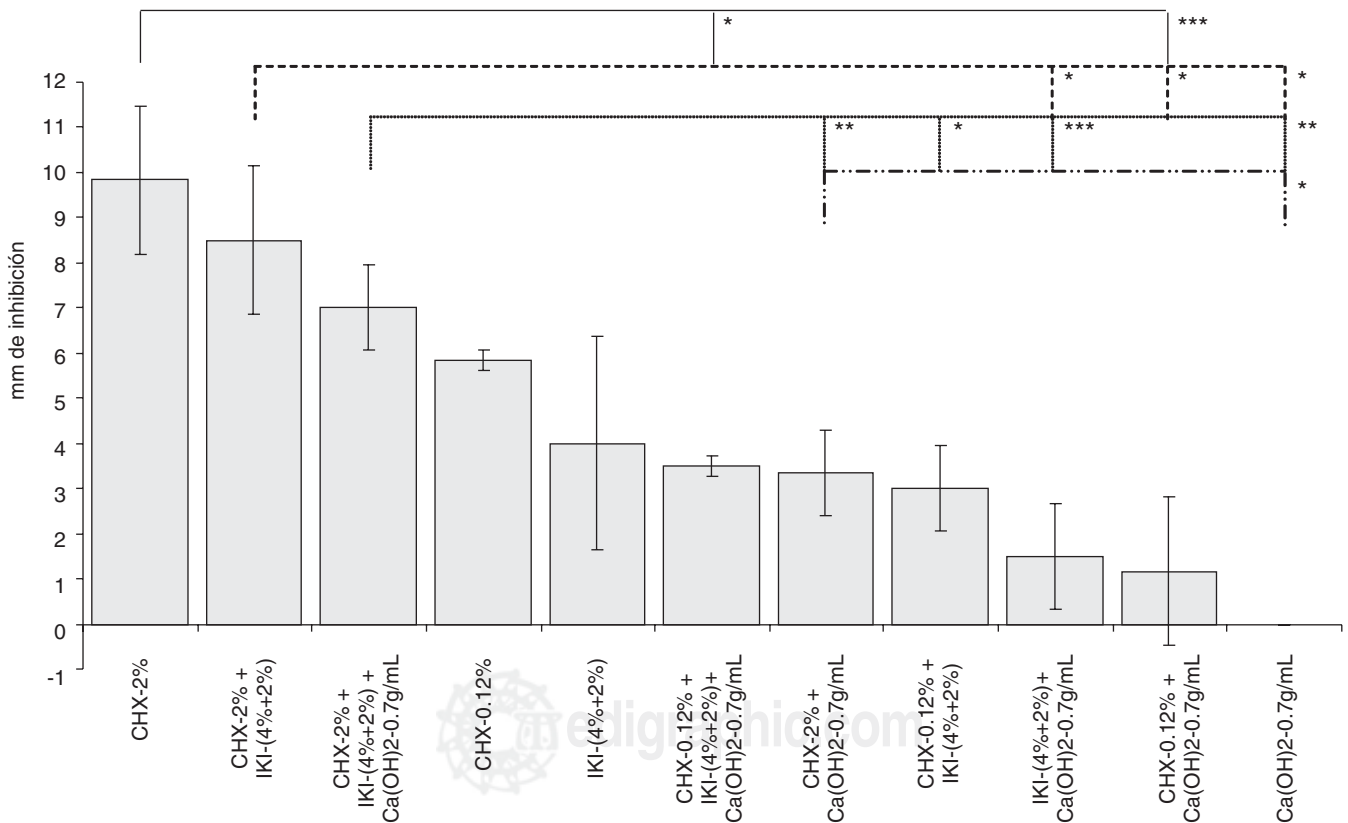


Figura 4. Inhibición promedio (mm ± DE) del crecimiento de *Fusobacterium nucleatum ss nucleatum* (ATCC 25585) en presencia de 3 medicamentos intraconducto en las concentraciones frecuentemente empleadas en la práctica clínica. Tres mediciones de cada zona de inhibición fueron registradas y promediadas para cada duplicado. Posteriormente se calculó una media entre duplicados. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 prueba t de Student.

CHX por ser un antiséptico de espectro amplio ha sido frecuentemente empleado como medicamento intraconduito en la práctica endodóncica.^{9,10} En el presente estudio se confirmó la actividad antimicrobiana de la CHX en las diferentes concentraciones que fueron evaluadas, siendo las concentraciones de 4%, 2% (concentración clínica) y 1% las que mostraron mejores resultados. Dicho hallazgo coincide con algunos estudios previos en los que se determinó que la CHX al 2% proporcionaba una actividad antimicrobiana efectiva.^{10,13,15,16} En otro estudio, se demostró que la CHX al 2% eliminó al 70% de los microorganismos que fueron probados.³¹ Sin embargo, la CHX al 0.12% mostró baja actividad antimicrobiana.^{14,31} Cabe señalar que en contraste con los resultados del presente estudio, otros reportes han sugerido que las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano no variaron significativamente con el uso de CHX al 2%, 0.2 y 0.12%.^{9,18}

El IKI es comúnmente considerado un agente antibacteriano efectivo en la terapia endodóncica.^{26,32} Sin embargo, en el presente estudio el IKI tuvo efectos antimicrobianos menores que la CHX. A diferencia de la CHX con la que se observó un aumento en la inhibición del crecimiento bacteriano relativamente proporcional al aumento en la concentración del medicamento, el IKI al 1% + 0.5% mostró mejor efecto antimicrobiano que las concentraciones mayores de 8% + 4%, 4% + 2% y 2% + 1%. Una posible explicación, podría ser que a diferencia de las concentraciones más elevadas, las zonas de inhibición para la concentración de 1% + 0.5% se presentaron de manera regular. A pesar de que varios estudios han reportado que el IKI (4% + 2%) fue un agente antimicrobiano más potente que la CHX para inhibir el crecimiento de *F. nucleatum*³² y *Enterococcus faecalis*,²⁷ los resultados del presente estudio no coinciden con dichos reportes.

El Ca(OH)_2 es un medicamento intraconduito considerado como de valor terapéutico alto en el tratamiento endodóncico de dientes necróticos infectados, ya que su pH alcalino de 12.5 le confiere actividad bactericida.¹⁹ En el presente estudio, sin embargo, el Ca(OH)_2 mostró muy baja actividad antimicrobiana. Las pruebas de difusión en agar, frecuentemente han sido empleadas para determinar la eficacia para inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro* de diversos medicamentos. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante dichas pruebas son dependientes de la capacidad de los medicamentos para difundirse en el agar.³³ En un estudio se sugirió que el Ca(OH)_2 tenía poca efectividad para inhibir el crecimiento de *E. faecalis* en placas de agar, debido a que poseía baja capacidad para difundirse en el agar, resultando esto en un

pH reducido y por lo tanto en la escasa capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano detectada con dicha técnica.³³ Sin embargo, otros estudios han demostrado que el Ca(OH)_2 posee una capacidad similar que la CHX para difundirse en agar³⁴ y que el efecto antimicrobiano del Ca(OH)_2 es insuficiente para inhibir el crecimiento tanto de *E. faecalis* como de otros microorganismos comúnmente detectados en conductos radiculares infectados como especies de *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Eubacterium*.³⁵ Por lo tanto, la capacidad de difusión en agar del Ca(OH)_2 no ha sido considerada como una causa probable de los malos resultados obtenidos con dicho medicamento en el presente estudio, sino que hemos considerado que reflejan una incapacidad real del Ca(OH)_2 para inhibir el crecimiento de la especie bacteriana evaluada.

Algunos reportes han sugerido una potenciación de la actividad antimicrobiana con el uso de diferentes combinaciones de los tres medicamentos que fueron evaluados en el presente estudio.^{32,36} Algunos estudios han sugerido que la CHX al combinarse con el Ca(OH)_2 proporciona mejores resultados que cualquiera de los 2 medicamentos de manera individual.^{12,24} Sin embargo, en el presente estudio no se observó un efecto sinérgico de los medicamentos en las combinaciones evaluadas. Por ejemplo, la CHX al 2% en combinación con Ca(OH)_2 mostró una actividad antimicrobiana menor que la CHX al 2% al ser empleada individualmente. Aún más, el efecto antimicrobiano individual de la CHX y del IKI se redujo cuando fueron combinados con otros medicamentos. La combinación de medicamentos intraconduito aumentó discretamente la capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano únicamente del Ca(OH)_2 , sin embargo, dicho aumento se dio en perjuicio de los efectos individuales del medicamento utilizado para la combinación. Otros estudios han reportado resultados similares con la combinación de medicamentos intraconduito.³⁷

CONCLUSIONES

En base a los resultados del presente estudio se puede concluir que:

1. La clorhexidina al 4%, 2% y 1% empleada de manera individual, presentó una actividad antimicrobiana elevada.
2. El yoduro de potasio yodado, mostró una actividad antimicrobiana moderada contra *F. nucleatum*.
3. El hidróxido de calcio presentó una escasa capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano de la especie que fue evaluada en el presente estudio.

4. La combinación de medicamentos intraconducto no potenció los efectos antimicrobianos de los medicamentos evaluados.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado en parte por los Proyectos J34909-M (CONACyT) e IN205402 (PA-PIIT, DGAPA, UNAM) de la Dra. Ximénez-Fyvie, y por la Facultad de Odontología, UNAM.

Los autores agradecen las facilidades y la asesoría experimental proporcionadas por C.D. Argelia Almaquer Flores y C.D. Araceli Salgado Martínez del Laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

REFERENCIAS

- Walton RE, Torabinejad M. Endodoncia. *Principios y práctica*. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill. México. 1996: 298-301.
- Cohen S, Burns RC. *Vías de la pulpa*. Octava Edición. Editorial Elsevier Science. Madrid. 2002: 493-497.
- Ingle JI, Bakland LK. *Endodoncia*. Quinta Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. 2004: 4-67.
- Morrier JJ, Benay G, Hartmann C, Barsotti O. Antimicrobial activity of Ca(OH)₂ dental cements: an *in vitro* study. *J Endodon* 2002; 29(1): 51-54.
- Langeland K, Guldener PH. *Endodoncia*. Editorial Springer. México. 1995: 79-92.
- Podbielski A, Spahr A, Haller B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. *J Endodon* 2003; 29(5): 340-345.
- Slots J. *Contemporary oral microbiology and immunology*. Editorial McGraw-Hill. Boston, USA. 1992; 314-317.
- Gomes BP, Sato E, Ferraz RC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recommendation of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J* 2003; 36: 604-609.
- Randi FC, Figueiredo de Almeida GP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endodon* 2001; 27(7): 452-455.
- Leonardo MR, Filho MT, Silva LA, Filho NP, Bonifacio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endodon* 1999; 25(3): 167-171.
- Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP et al. Antimicrobial substantivity of bovine root denton exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endodon* 2000; 26(11): 652-655.
- Gomes BP, Souza SF, Ferraz RC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J* 2003; 36: 267-275.
- Gomes BP, Ferraz RC, Berber VB, Vianna ME, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34: 424-428.
- White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endodon* 1997; 23(4): 229-321.
- White RR, Lusk SS. Effect to concentration and time on substantivity of a chlorhexidine endodontic irrigant. *J Den Res* 1998; 77: 271.
- Weber CD, McClanahan SB, Millar GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant ton residual antimicrobial activity in root canals. *J Endodon* 2003; 29(9): 562-564.
- Evans MD, Baumgarther JC, Khemaleelakul S, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: Chlorhexidine paste as an Intracanal medication in bovine dentin. *J Endodon* 2003; 29(5): 338-9.
- Siqueira JF, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacterial. *J Endodon* 1998; 24(6): 414-416.
- Figuereido BP, Randi FC, Devora FG, Luiz PR, Zaia AA, Batista FT et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endodon* 2002; 28(11): 758-761.
- Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32: 361-369.
- Estrela C, Rodríguez EC, Luschke BL, Djalma PJ. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endodon* 2001; 27(12): 720-23.
- Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J* 1997; 30: 155-159.
- Olsen MH, Difiore PM, Dixit SN, Veis A. The effects of calcium hydroxide inhibition on LPS induced release of IL-1 β from human monocytes in whole blood. *J Endodon* 1999; 25: 289.
- Nelson-Filho P, Leonardo MR, Becerra SL, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endodon* 2002; 28(10): 694- 696.
- Safavi KE, Spångberg LS, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endodon* 1990; 16(5): 207-210.
- Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 2001; 91: 579-586.
- Baker NE, Liewehr FR, Buxton TB, Joyce AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide, iodine potassium iodide, betadine, and betadine scrub with and without surfactant against *E. faecalis in vitro*. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 2004; 98: 359-64.
- Waltimo TM, Ostavik D, Sirén EK, Haapasalo PP. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 1999; 32: 421-429.
- Lin Y, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: Part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endodon* 2003; 29(9): 565-566.
- Dameto FR, Randi FC, Figueiredo BP, Zaia AA, Batista FT, Souza-Filho FJ. *In vitro* of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 2005; 99: 768-72.
- Estrela C, Holland R, Bernabé PF, Souza V, Estrela CR. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dogs' teeth with apical periodontitis. *Braz Dent J* 2004; 15(3): 181-185.
- Sirén EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Ostavik D. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 326-331.

33. Barbosa CA, Gonçalves, RB, Siqueira JF, De Uzeda M. Evaluation on the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endodon* 1997; 23(5): 297-300.
34. Basrani B, Tjäderhance L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP et al. Efficacy of chlorhexidine and calcium hydroxide containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 2003; 96: 618-624.
35. Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation y dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J* 2002; 35: 13-21.
36. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root filled teeth with apical periodontitis, *Int Endod J* 1998; 31: 1-8.
37. Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endodon* 2002; 28(2): 102-104.

Dirección para correspondencia:

Verónica Calderón Castillo

Av. Tenochtitlan Núm. 46

Col. Santa Cruz Acalpixca Xochimilco

Tel: 2157-4937

Correo electrónico: verocalderon2000@yahoo.com.mx