

EFFECTO BACTERICIDA DEL LÁSER DE Er,Cr:YSGG
EN EL INTERIOR DEL CONDUCTO RADICULAR.

Tesis Doctoral

Josep Arnabat Domínguez

Directores

Prof. Leonardo Berini Aytés

Prof. Miguel Viñas Ciordia

DEPARTAMENT D'ODONTOESTOMATOLOGIA

FACULTAT D'ODONTOLOGIA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

4. MATERIAL Y MÉTODO

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Material

4.1.1. Dientes

Los dientes que se han utilizado en este estudio han sido dientes humanos unirradiculares y con solo un conducto, que fueron extraídos por diferentes causas, principalmente por caries o por enfermedad periodontal avanzada.

Se seleccionaron únicamente los dientes -indistintamente del maxilar superior o de la mandíbula- cuyas raíces eran rectas descartándose todos aquéllos cuya morfología externa presentaba una curvatura o algún tipo de angulación acusada. Una vez extraídos los dientes, se limpiaron y se eliminaron los tejidos blandos que estaban adheridos a la superficie radicular así como también los restos de cálculo; ello se realizó mediante una cureta e irrigación profusa con agua destilada.

Posteriormente se conservaron en una solución suero fisiológico a temperatura ambiente hasta que fueron utilizados.

El tiempo máximo transcurrido, desde la extracción hasta el experimento, fue de 4 meses.

El total de dientes utilizados ha sido de 216 en el estudio microbiológico y de 40 en el estudio del incremento térmico.

4.1.2. Cepa bacteriana: *Enterococcus faecalis* CETC 10541

Para este estudio se ha empleado la bacteria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*. Dicha bacteria ha sido obtenida de la colección de cepas bacterianas que la Universidad de Barcelona tiene en el Departamento de Patología y Terapéutica experimental del Campus de Bellvitge. *Enterococcus faecalis* CECT 10541, es un

Enterococcus, que pertenece al serogrupo D de Lancefield (especificidad ligada a los ácidos lipoteicoicos) y engloba a un conjunto de especies similares a *Streptococcus*. Su hábitat suele ser el tubo digestivo, y normalmente se encuentran en el medio ambiente y particularmente en las heces de los vertebrados. Las especies que son más frecuentemente aisladas en clínica son *Enterococcus faecalis* (80-90%) y *Enterococcus faecium* (5-10%); éstas son las que se toman como referencia de especies tipo dentro del género de los *Enterococcus*, y son también los más frecuentes en la patología humana.

Las características más destacables del *Enterococcus faecalis* son las siguientes:

Son células esféricas o ovoidales -o sea cocos- que miden de 0.6-2.0 x 0.6-2.5 µm. En medio líquido se encuentran asociados en parejas o en cadenas cortas. No pueden formar endoesporas; algunas veces pueden ser móviles mediante un flagelo corto. Son Gram-positivos, anaerobios facultativos, quimioorganotróficos con metabolismo fermentativo (normalmente fermentan lactosa); son catalasa negativos, raramente reducen los nitratos y su virulencia va ligada a una cápsula polisacárida. Tiene requerimientos nutricionales complejos y normalmente crecen a temperaturas entre 10-45°C aunque su temperatura óptima es de 37°C. Son moderadamente sensibles a los antibióticos que actúan a nivel de la pared celular.

4.1.3. Medios de cultivo

Para poder hacer crecer -cultivar- bacterias en el laboratorio se deben satisfacer todos los requerimientos físicos y de nutrientes del microorganismo que queremos que crezca. Los medios de cultivo líquidos (medios en caldo o broth) o

sólidos (medios en agar) proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos.

Para llevar a cabo los experimentos realizados en este trabajo se han utilizado los siguientes medios de cultivo:

1. BHI (Infusión de cerebro y corazón)

Es un medio altamente nutritivo para el cultivo de una variedad de microorganismos fastidiosos -por su crecimiento lento- incluyendo los estreptococos, neumococos y meningococos. Debido a sus cualidades nutritivas también es ideal para el cultivo de muestras procedentes de sangre.

Se ha utilizado para el cultivo de los microorganismos en el medio líquido; su composición en g/l de agua destilada es la siguiente (Biomérieux, Lyon, Francia):

Infusión de cerebro de ternera	200.0	Glucosa	2.0
Infusión de corazón de ternero	250.0	Cloruro sódico	5.0
Bio-Gelytone	10.0	Fosfato disódico	2.5

Para hacer la preparación se debe disolver 37g del medio en polvo en un litro de agua destilada o desionizada; luego repartir y esterilizar al autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2. MH (Agar de Mueller-Hinton)

El medio de Mueller-Hinton se utiliza, normalmente, para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a los agentes bacterianos.

Su composición en g/l de agua destilada o desionizada es la siguiente:

Caseína hidrolizada	17.5	Extracto de carne	4.0
Almidón	1.5	Agar	5.0

El medio se ha preparado a partir de un producto comercial en polvo (Scharlau, Barcelona, España) haciendo una suspensión de 38g de este preparado

en un litro de agua destilada/desionizada y posteriormente esterilizándolo al autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3. MH (Caldo de Mueller-Hinton)

Es un medio de cultivo idéntico al anterior en cuanto a su uso, preparación y composición pero al ser un preparado en medio líquido, no contiene los 15gr de agar en su composición.

4. TSA (Agar de Trypticase y Soja)

Es un medio con una rica y abundante base nutritiva que hace que pueda ser utilizado para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos alguno de los más exigentes. Su composición en g/l de agua es la siguiente (Scharlau, Barcelona, España):

Hidrolizado trépsico de caseína	15.0	Peptona de soja	5.0
Cloruro sódico	5.0	Agar	15.0

Su preparación se realizó añadiendo 40gr del producto en polvo en un litro de agua destilada/desionizada y posteriormente esterilizando la solución en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5. TSB (Caldo de Trypticase y Soja)

Es un medio líquido altamente nutritivo de uso general, formulado de acuerdo con la USP (Farmacopea Americana) y la FDA (Food and Drug Administration). Su fórmula en g/l (Scharlau, Barcelona, España) es:

Peptona de caseína	17.0	Peptona de soja	3.0
Cloruro sódico	5.0	Fosfato monopotásico	2.5
Dextrosa	2.5		

Permite el crecimiento de la mayor parte de microorganismos tanto aeróbicos como anaeróbicos facultativos cuando sus requerimientos son muy notables.

Su preparación se realizó añadiendo 30gr de polvo comercial en un litro de agua destilada que se distribuyó en tubos de ensayo siendo esterilizado después al autoclave durante 15 minutos a 121°C.

6. AT (Agar Blando o Agar-Agar)

Es el agar purificado del que se han eliminado o reducido al máximo las materias extrañas, las partes pigmentadas y las sales. Normalmente se usa en medios de cultivos sólidos a una concentración del 1-2%; las soluciones al 1.5% dan geles suficientemente consistentes para poder hacer estrías en su superficie. El uso de agar en pequeñas cantidades (0.05-0.3%) es frecuente para determinar la movilidad y el crecimiento de anaerobios y microaerófilos. La adición de estas cantidades de agar en medios líquidos permite que existan todos los grados de tensión de oxígeno y, de esta forma, facilita el crecimiento y desarrollo de muchos organismos anaerobios y aerobios de difícil crecimiento.

El agar bacteriológico, un polisacárido obtenido de algas, es insoluble en agua fría pero soluble en agua caliente, se mantiene en estado líquido a la temperatura de ebullición del agua y se vuelve sólido cuando se enfría por debajo de 44°C.

El Agar utilizado fue preparado de la siguiente forma: se disolvió 3-4 ‰ de agar (Scharlau, Barcelona, España) en agua destilada/desionizada y se repartió la cantidad preparada en tubos de 3 ml cada uno; acto seguido se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 121°C. Para mantener el agar en forma líquida se colocó en tubos, en el horno a 50°C, hasta el momento de su uso.

7. Solución de Ringer 1/4:

Es la solución isotónica que se ha utilizado para las suspensiones celulares.

Su composición es la siguiente:

Cloruro sódico	2.250	Cloruro potásico	0.105
Cloruro cálcico	0.120	Bicarbonato sódico	0.050

Para obtener una solución isotónica con células eucariotas se deben disolver 10g de polvo comercial (ADSA Micro, Barcelona, España) en un litro de agua destilada/desionizada; si se trata de células procariotas -como este caso- se debe disolver 2.5g de polvo comercial en un litro de agua destilada/desionizada. El volumen de la disolución se distribuye en diferentes recipientes y se esteriliza al autoclave a 121°C durante 15 minutos.

La solución salina de Ringer 1/4 es un medio isotónico más equilibrado que la simple solución salina de cloruro sódico y su composición permite su esterilización al autoclave sin que se formen precipitados.

La solución de Ringer se utiliza rutinariamente, en los estudios sobre bacterias, a una disolución de 1/4 para obtener suspensiones celulares o para hacer un banco de soluciones. Al proporcionar una presión osmótica similar a la que tiene -en su interior- la célula bacteriana permite mantener las bacterias durante un cierto tiempo sin que éstas se destruyan.

4.1.4. Aparatología para medir el aumento de temperatura

Para la medición de la temperatura se utilizó un termopar del tipo K que se colocó a nivel del ápice. El principio de este aparato se basa en la fuerza electromotriz (en mV) que se produce al establecer una diferencia de temperatura entre los extremos soldados de dos filamentos termoeléctricos, de materiales

distintos -en el tipo K de níquel-cromo y níquel-aluminio- y los extremos libres de ambos filamentos (Figura 19). El termopar permite medir la temperatura en incrementos de 0.1°C.



Figura 19. Termopar tipo K.

Para utilizar adecuadamente esta tensión termoeléctrica es preciso que los extremos libres de los hilos termoeléctricos se encuentren a una temperatura constante o de referencia y conectados a un milivoltímetro de cuadro móvil -graduado en grados centígrados- que indicará en todo momento el valor equivalente en grados centígrados de la fuerza electromotriz dada por el termoelemento. En este experimento se ha utilizado el milivoltímetro Protek TM-1300K thermometer (T equipment, Hazlet NY, EE.UU.) (Figura 20).



Figura 20. Milivoltímetro Protek TM-1300.

4.1.5. Láser de Er,Cr:YSGG

El láser que se ha empleado durante este estudio ha sido el láser de Erbium, Chromium: Yttrium, Scandium, Gallium Garnet (Er,Cr:YAGG). El tipo utilizado ha sido el Waterlase[™] (Biolase, San Clemente, EE.UU.) (Figura 21).



Figura 21. Aparato de láser de Er,Cr:YSGG Waterlase[™]

Es un láser sólido -que trabaja en modo pulsado- y en el que su medio activo es un cristal (granate) de Ytrio, Scandio y Galio y que se ha dopado con Erblio y Cromo. Todo ello le confiere una longitud de onda de 2780nm (2.78 μ m). Por lo tanto es un láser de clase IV que se halla en el infrarrojo y que no es visible al ojo humano.

Es un láser pulsado que trabaja a una frecuencia de 20Hz, ello quiere decir que se producen 20 pulsos por segundo. En este aparato la frecuencia está prefijada y no es posible modificarla. La duración del pulso se establece entre los 140-150 microsegundos.

El rango de potencias a las que se puede trabajar varía desde 0 a 6W, con incrementos de 0.25. La energía por pulso varía desde 0 a 300mJ.

Dado que este láser produce una luz invisible al ojo humano se le ha añadido una luz guía (aiming beam) para que se pueda ver donde actúa. Esta luz guía es un láser rojo de 655nm (Láser de clase I).

El láser de Er,Cr:YSGG trabaja en conjunción con un spray de agua. El agua que se utiliza para esta pulverización debe ser agua destilada o estéril. Este spray de agua forma unas partículas de un tamaño entre 2 a 200 micras que pueden adquirir una velocidad máxima de 100 m/s. La zona de interacción del láser con estas partículas está situada entre 0.5 y 3 micras del extremo del tip que se inserta en el cabezal de la pieza de mano (Figura 22).

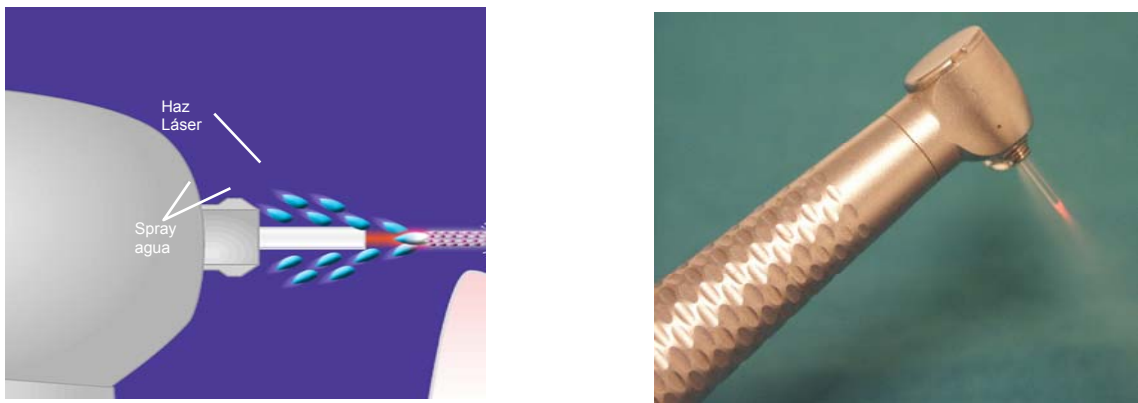


Figura 22. Interacción del laser de Er,Cr:YSGG con el spray de agua. Se puede ver la luz guía (aiming beam) de color rojo en el extremo del tip.

El haz de luz láser se transmite desde la cavidad de resonancia hasta la pieza de mano mediante una fibra de vidrio. Esta fibra de vidrio, que en la actualidad es flexible, deberá estar siempre rodeada externamente por un conducto de aire y por otro de agua que evitan su sobrecalentamiento. En la parte final de esta fibra se acopla la pieza de mano (Figura 23).



Figura 23. Pieza de mano que se acopla a la fibra.

Esta pieza de mano dispone de una zona interna hueca en la cual se alojará la fibra de vidrio. En el cabezal de la pieza mano hay una pequeña ranura en donde se insertará un tip. Va a ser través del extremo de este tip por donde va a salir el haz de láser hacia el exterior de la unidad.

En la actualidad existen dos diferentes piezas de mano, una angulada (con una angulación de 90°) y otra que es recta (Figura 24).



Figura 24. Piezas de mano angulada y recta

En el cabezal de cada pieza de mano se colocará una punta o tip; por él va a salir el haz de luz láser. Estas puntas o tips son intercambiables y existen diferentes diseños y formas.

La pieza de mano que se ha utilizado en este estudio es la angulada (MVP, Biolase, San Clemente, EE.UU.). Previamente a su utilización se procedió a su esterilización en un autoclave (Miniclave 21L, Matachana, Barcelona, España) a una temperatura de 134°C, presión: 2 Atmosferas, y tiempo: 15 minutos.

Los tips que se han utilizado han sido los Z2-tips (Biolase, San Clemente, EE.UU.) (Figura 25) que tienen diámetro de 200 micras y que se han diseñado para poder introducirse en el interior de los conductos radiculares.



Figura 25. Endo Tip Z2

Estos tips pueden tener distintas longitudes y son muy flexibles ya que están fabricados con fibra de vidrio (Figura 26).



Figura 26. Flexibilidad del Endo Tip Z2

Cuando se trabaja con estos tips hay que considerar que existe una pérdida de potencia de alrededor de un 70%; ello quiere decir que cuando en el display del láser indica 1W de potencia, con este tipo de tips la eficacia real sólo es de 0.3W.

Antes de cada irradiación se comprobó la potencia real en la punta del tip midiéndola con un Wattmeter (Coherent Inc., Santa Clara, EE.UU.). Previa a su utilización los tips fueron esterilizados al igual que la pieza de mano (autoclave Miniclave 21L, Matachana, Barcelona, España) a una temperatura de 134°C, presión: 2 atmósferas, y tiempo: 15 minutos).

4.2. Método

4.2.1. Preparación de los dientes

Previamente al inicio del experimento se procedió a preparar los dientes según el siguiente protocolo:

Con una fresa de diamante para tallado (ref. 806-314 Meisinger, Düsseldorf, Alemania), se seccionó la corona a nivel de su límite amelocementario y se dejó sólo la raíz. Para poder entrar en el estudio se escogieron las raíces que tuviesen una longitud entre 12 y 15mm, pero no se tuvo en cuenta el grosor de la raíz.

Una vez seleccionadas las raíces, se procedió a la medición de la longitud de trabajo mediante una lima tipo k del nº 15 (Maillefer, Ballaigues, Suiza). En este momento se eliminaron aquellos dientes que presentaban más de un conducto radicular, y se conservó el resto de dientes para su utilización en el estudio.

Todos los dientes seleccionados fueron sometidos a la limpieza biomecánica mediante técnica de fuerzas laterales y con una conformación del conducto en step-back. El límite de trabajo se colocó a 1mm del ápice radiográfico. En primer lugar se emplearon las fresas de Gates del número 1 y del número 2 (Maillefer, Ballaigues, Suiza) para la porción más coronal del conducto radicular y luego se trabajó la zona apical con limas tipo k (Maillefer, Ballaigues, Suiza) de los

números 15, 20, 25, 30 en la zona de la longitud de trabajo y limas del 35 a 2mm y del 40 a 3mm del límite de trabajo, creándose de esta forma un step-back.

Toda la instrumentación se realizó de forma manual y bajo una profusa irrigación en el interior del conducto con hipoclorito sódico al 0.5% (Hipoclorito 0.5% Farmacia Torné, Barcelona, España). Una vez finalizada la instrumentación, se introdujo en el interior del conducto una solución de EDTA al 15% (ácido etilendiamino tetracético) (Q Solución EDTA, Dentaflux, Madrid, España) durante 2 minutos para eliminar el barrillo dentinario (smear layer).

Posteriormente los dientes fueron irrigados de nuevo con hipoclorito sódico al 0.5% y, por último, recibieron una irrigación profusa de agua destilada para eliminar todos los restos de agentes químicos.

Una vez los dientes estuvieron secos, en la zona apical se aplicaron 3 capas de laca de uñas para evitar que existiera una filtración en esta zona. Posteriormente los dientes fueron otra vez irrigados con agua destilada para comprobar que no existía ninguna fuga por la zona apical.

Una vez secados de nuevo los dientes, fueron introducidos en bolsas para esterilización y se procedió a su esterilización. Las bolsas de esterilización fueron cortadas de forma que tuviesen una dimensión de 15mm x 10mm, cerrándose herméticamente mediante una selladora térmica (Hygopac Dürr Dental, Bietigheim Bissingen, Alemania). El número máximo de dientes que se introducía en cada una de las bolsas era de 5.

Los dientes se esterilizaban durante las 24 horas previas a la inoculación de los microorganismos. La esterilización de los dientes se ha efectuado en un autoclave (Miniclave 21L Matachana, Barcelona, España). Los parámetros seguidos para conseguir la esterilización de los dientes fueron los siguientes:

temperatura: 134°C, presión: 2 Atmosferas, y tiempo: 15 minutos. Una vez terminado el ciclo, las bolsas se dejaban secar completamente.

Para el estudio de la temperatura se han utilizado dientes humanos de la misma procedencia, que una vez extraídos se han conservado en suero fisiológico hasta su utilización; se escogieron para ello 10 incisivos inferiores y 10 caninos, todos ellos unirradiculares.

4.2.2. Método de inoculación

El protocolo que se ha seguido para la inoculación de *Enterococcus faecalis* fue el siguiente:

Tras incubación a 37°C durante 24 horas se verificó el crecimiento por la turbidez del medio. Se preparó a partir del cultivo un nuevo cultivo de noche. De éste se inoculó 1ml a 4ml de medio fresco y se controló el crecimiento mediante lectura espectrofotométrica (Unicam UV-2 a 560nm). Al alcanzarse el nivel adecuado se centrifugó el cultivo a 5000rpm durante 15 minutos. Se resuspendió el sedimento en la gota residual. De la suspensión restante se enumeró la población microbiana y cada diente se inoculó con 10µl de la suspensión microbiana (Figura 27).



Figura 27. Inoculación con pipeta, con puntas de plástico desechables.

En cada uno de los experimentos se dejó un diente sin inocular para comprobar la correcta esterilización de la muestra. Una vez los dientes estaban contaminados se colocaron en recipientes individuales tipo “eppendorf”, que previamente también se habían esterilizado en el autoclave. Una vez etiquetados, cada uno de los tubos “eppendorf” se colocó en una gradilla para proceder a su transporte. En todo momento los dientes se mantuvieron en posición vertical. Finalmente los dientes se dejaron en una estufa a 37°C durante 24 horas permitiendo así que las bacterias colonizaran y se adhirieran al conducto radicular.

4.2.3. Método de irradiación

En el estudio definitivo se realizaron 18 experimentos diferentes en los que los dientes fueron siempre contaminados con *Enterococcus faecalis*. Los tratamientos que se efectuaron fueron irrigando con NaOCl al 5% y al 0.5% e irradiando con el láser de Er,Cr:YSGG a diferentes parámetros.

Todos los experimentos se realizaron en las siguientes condiciones:

Una vez los dientes habían sido contaminados se introducían en el interior de tubos “eppendorf” y para poder ser transportados se colocaban en una gradilla de plástico. De esta forma en todo momento los dientes se mantenían verticales y en la misma posición.

Siempre se respetaron unas normas estrictas de asepsia. Cuando se llegaba a la sala donde estaba el láser se procedía de la siguiente forma: el operador iba vestido con bata quirúrgica, gorro y mascarilla -de papel y todos ellos desechables- y llevaba gafas adecuadas para la utilización de la aparatología láser. Obviamente también llevaba guantes -de látex- quirúrgicos estériles para no

contaminar el espécimen. El diente era asido con unas pinzas sin dientes previamente esterilizadas.

1. Tratamientos con hipoclorito sódico:

Las dos soluciones de hipoclorito sódico -5% y 0.5%- se guardaron en botellas de plástico opaco y en condiciones de ausencia de luz y de calor. Su caducidad se estimó en tres meses, transcurridos los cuales se despreciaron.

El método utilizado fue inocular 10 μ l de la solución de hipoclorito sódico pertinente en el interior del conducto radicular. Dicha inoculación se realizó mediante una micropipeta con una boquilla para 10 μ l. La solución se mantuvo durante 30 segundos en el interior del conducto radicular y posteriormente éste fue lavado con solución Ringer 1/4.

2. Tratamientos con el láser de Er,Cr:YSGG:

Para poder irradiar en el interior del conducto radicular se utilizó una punta “tip” de fibra de vidrio de un diámetro de 200 micras (Endo Tip Z2 Biolase, San Clemente, EE.UU.) que se adapta a la pieza de mano angulada.

En los tips colocamos un tope de goma similar a los que se utilizan con los instrumentos de endodoncia; de esta forma se podía calibrar la longitud de trabajo.

Tanto los tips como la pieza de mano del láser habían sido previamente esterilizados en un autoclave de vapor de agua.

Una vez conocida la longitud de trabajo (aproximadamente a 1mm del ápice radicular), se procedía a introducir el tip en el interior del conducto pero sin activarlo; una vez estaba en el interior entonces ya empezaba la activación del láser (Figura 28). Se realizaron dos tipos de movimiento -del tip- en el interior del conducto: por una parte un movimiento vertical desde el ápice hacia coronal; una vez allí se volvía a introducir el tip hacia el ápice, repitiéndose este movimiento

longitudinal hasta que terminaba el tiempo establecido para la irradiación. Además de este movimiento vertical se efectuaba, de forma simultánea, otro movimiento - éste describiendo pequeños círculos- para que de dicha forma la punta del tip estuviera en contacto con la mayor cantidad de superficie de dentina posible.

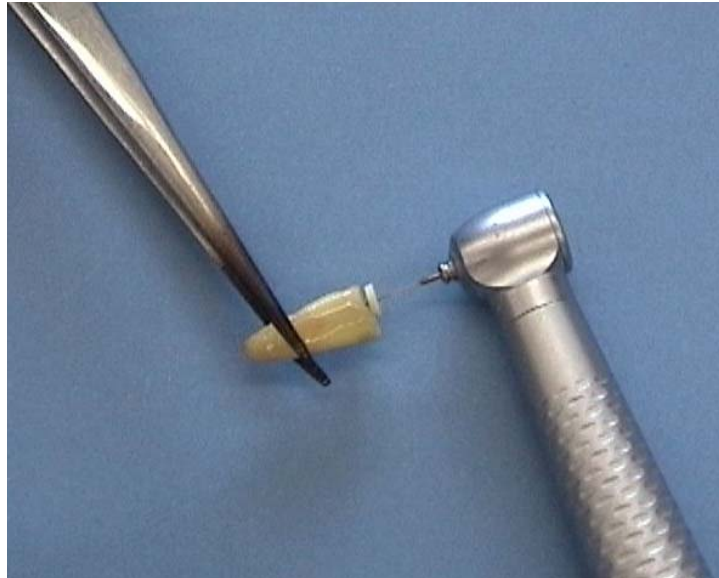


Figura 28. Irradiación de un diente con el láser de Er,Cr:YSGG.

Cabe resaltar que no se ha utilizado en ningún experimento el spray de agua ni el de aire que tiene el equipo de este láser.

Los parámetros que se utilizaron durante el estudio han sido los siguientes:

Potencias de 1W y 2W (como que este láser siempre trabaja con la misma frecuencia de 20 Hz -20 pulsos por segundo- la energía utilizada en cada caso fue de 50 mJ y de 100mJ respectivamente).

Sin embargo se ha de tener en cuenta que las fibras utilizadas tienen un factor de conversión de eficacia del 30%. Esto quiere decir que la potencia real a la que se trabajó no fue 1W sino que hubo una pérdida de potencia del 70%; ello nos indica que la potencia real cuando se trabajó a 1W fue de aproximadamente 0.3W y mientras cuando se hizo a 2W la potencia real fue de 0.6W.

La energía real aplicada por pulso en el tratamiento de 1W sería de 15 mJ y en el caso de 2W sería de 30 mJ.

La densidad de potencia real se calcularía teniendo en cuenta que el diámetro de la fibra que se ha utilizado es de 200 micras (radio= 100 micras) y la superficie es de $\pi r^2 = 3.1416 \times 0.1^2 = 0.0314\text{mm}^2$ o 0.000314 cm^2 .

Densidad de potencia para 0.3W (el panel de control del aparato señala 1W)

$$\text{Potencia} = 0.3\text{W} \quad \text{Superficie} = 0.000314 \text{ cm}^2$$

$$\text{DP} = P/S (\text{cm}^2) \quad 0.3/ 0.000314 = 955.41 \text{ W/ cm}^2$$

$$\text{DP} = 955.41 \text{ W/ cm}^2 \quad (\text{para los tratamientos realizados con 1W}).$$

Para una potencia de 0.6W (el panel de control del aparato señala 2W)

$$\text{DP} = P/S (\text{cm}^2) \quad 0.6/ 0.000314 = 1910.8\text{W/ cm}^2$$

$$\text{DP} = 1910.8 \text{ W/ cm}^2 \quad (\text{para los tratamientos realizados con 2W}).$$

La densidad de energía por pulso ha sido de :

En los tratamientos de 1W :

$$\text{Energía real por pulso} = 15 \text{ mJ} \quad \text{Superficie} = 0.000314 \text{ cm}^2$$

$$\text{DE (pulso)} = 47.7 \text{ J/ cm}^2$$

En los tratamientos de 2W

$$\text{Energía real por pulso} = 30 \text{ mJ} \quad \text{Superficie} = 0.000314 \text{ cm}^2$$

$$\text{DE (pulso)} = 95.5 \text{ J/ cm}^2$$

En los tratamientos con láser se han utilizando varios parámetros; éstos han sido:

a. Irradiación a 1W (real 0.3W) durante un periodo de 15 segundos, a la que seguía una parada de 15 segundos, y de nuevo una irradiación de 15 segundos. El total de tiempo de irradiación fue de 30 segundos (1W 30 seg.).

Energía total liberada= $0.3W \times 30 \text{ seg.} = 9 \text{ J.}$

b. Irradiación a 2W (real 0.6W) durante un periodo de 15 segundos, a la que seguía una parada de 15 segundos, y de nuevo una irradiación de 15 segundos. El total de tiempo de irradiación fue de 30 segundos (2W 30 seg.).

Energía total liberada= $0.6W \times 30 \text{ seg.} = 18 \text{ J.}$

c. Irradiación a 1W (real 0.3W) durante un periodo de 30 segundos, a la que seguía una parada de 15 segundos, y de nuevo una irradiación de 30 segundos. El total de tiempo de irradiación fue de 60 segundos (1W 60 seg.).

Energía total liberada= $0.3W \times 60 \text{ seg.} = 18 \text{ J.}$

d. Irradiación a 2W (real 0,6W) durante un periodo de 30 segundos, a la que seguía una parada de 15 segundos, y de nuevo una irradiación de 30 segundos. El total de tiempo de irradiación fue de 60 segundos (2W 60 seg.).

Energía total liberada= $0.6 \times 60 \text{ seg.} = 36 \text{ J.}$

e. Irradiación a 1W (real 0,3W) durante un periodo de 30 segundos, a la que seguía una parada de 15 segundos, repitiéndose este proceso un total de 4 veces. El total de tiempo de irradiación fue de 120 segundos (1W 120 seg.).

Energía total liberada= $0.3 \times 120 \text{ seg.} = 36 \text{ J.}$

4.2.4. Método de contaje

Después de haber irradiado los dientes previamente colonizados, se procedió al recuento de las bacterias del interior del conducto radicular. El protocolo seguido para efectuar este recuento de bacterias fue el siguiente:

Inmediatamente después de su recepción en el laboratorio tras recibir la irradiación con láser- se procedió a llenar cada tubo eppendorf (que en su interior contenía un diente) con solución de Ringer $\frac{1}{4}$ estéril con 500 μ l (Figura 29).



Figura 29 .Tubo eppendorf con el diente en su interior al que se le han añadido, mediante una pipeta con punta de plástico desechable, 500 μ l de Ringer $\frac{1}{4}$.

Para desligar los microorganismos de la superficie del conducto radicular se sometió el conjunto a tratamiento con un homogenizador (Vortex) durante tres periodos de 15 segundos cada uno. Posteriormente se sometió a un tratamiento con ultrasonidos en baño ultrasónico durante tres periodos de 30 segundos cada uno (Figura 30).



Figura 30. Aplicación de vibración sobre el eppendorf que contiene el diente y la solución de Ringer.

La aplicación de vibración y ultrasonidos es necesaria para desincrustar las bacterias que pudieran estar adheridas en las paredes del conducto radicular. En realidad un procedimiento como el descrito sólo desincrusta una parte de la población bacteriana. Sin embargo si el tratamiento se realiza de forma exactamente igual en todos los casos (incluidos los controles sin tratamiento) puede asumirse que la porción de la población bacteriana desligada es aproximadamente (y razonablemente) igual en todos los casos.

Para titular la población bacteriana se procedió a preparar bancos de diluciones sucesivas del líquido contenido en el tubo eppendorf de modo que la dilución abarcara los niveles poblacionales presuntamente cultivables de cada una de las muestras. De cada una de las diluciones se sembraron dos placas de medio de cultivo extendiéndose la muestra mediante el uso de una asa de Drigralski. Las placas se incubaron durante 24 horas en estufa de incubación a 37°C tras lo que se contaron las colonias aparecidas en la superficie del agar y se procedió al cálculo de la población superviviente cultivable.

4.2.5. Método para evaluar el incremento de temperatura

A todos los dientes unirradiculares que fueron seleccionados en este estudio, para evaluar el incremento de temperatura, se les seccionó -con una fresa de diamante para tallado (ref. 806-314 Meisinger, Düsseldorf, Alemania)- la corona a nivel del límite amelocementario y se dejó sólo la raíz. Se emplearon 40 dientes , 20 de ellos eran incisivos y otros 20 eran caninos.

Los dientes seleccionados fueron sometidos a la limpieza biomecánica mediante técnica de fuerzas laterales con limas tipo k (Maillefer, Suiza) de los números 15, 20, 25, 30.

Toda la instrumentación se realizó de forma manual y bajo una profusa irrigación en el interior del conducto con hipoclorito sódico al 0.5% (Hipoclorito 0.5%, Farmacia Torné, Barcelona, España). Una vez finalizada la instrumentación, se introdujo en el interior del conducto una solución de EDTA al 15% (ácido etilendiamino tetracético) (Q Solución EDTA, Dentaflux, Madrid, España) durante 2 minutos para eliminar el barrillo dentinario (smear layer).

Posteriormente los dientes fueron irrigados de nuevo con hipoclorito sódico al 0.5% y, por último, recibieron una irrigación profusa de agua destilada para eliminar todos los restos de agentes químicos.

Los dientes fueron esterilizados en un autoclave (Miniclave 21L Matachana, Barcelona, España), con los siguientes parámetros: temperatura: 134°C, presión: 2 Atmósferas, y tiempo: 15 minutos.

Para poder medir la longitud de trabajo se colocó un tope de goma en la punta de la lima. Una vez conocida la longitud de trabajo se introdujo la punta en el interior del conducto y se activó el láser de Er,Cr:YSGG a una potencia de 1W y de 2W. A partir de este momento se fue moviendo la punta en sentido apical hasta

llegar a un milímetro del ápice (longitud de trabajo) y posteriormente en sentido coronal a una velocidad aproximada de 2 mm por segundo. Este movimiento se realizó de forma circular y se hizo repetidamente durante 30 segundos. A los 30 segundos -en todos los casos- se detenía la irradiación y se medía inmediatamente el aumento de temperatura que se había producido. La lectura de la temperatura se volvía a realizar a los 30 segundos de haber finalizado la irradiación. Se irradiaron 10 incisivos a 1W, 10 incisivos a 2W, 10 caninos a 1W y 10 caninos a 2W.

Para simular un medio lo más parecido a la realidad -los dos filamentos del termopar tipo K- se mantuvieron pegados al diente entre los dedos pulgar e índice (Figura 31) tal como ya efectuaron y recomendaron otros autores (Barkhordar y cols. 1990, Ramsköld y cols. 1997). De esta forma se intentó simular la presencia del ligamento periodontal mediante un tejido vivo -la pulpa del dedo- que mantiene una microcirculación sanguínea alrededor del diente de forma bastante parecida a lo que ocurre en la cavidad bucal.

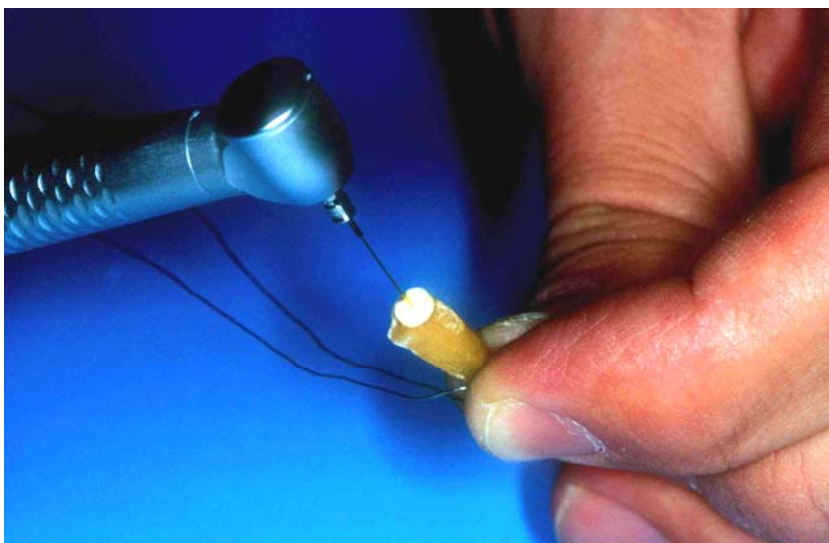


Figura 31. El termopar está unido al diente mediante los dedos índice y pulgar.

4.2.6. Análisis estadístico

En el estudio sobre el incremento térmico únicamente se ha efectuado un análisis descriptivo puesto que sólo se quería objetivar la magnitud del aumento de temperatura que se generaba con la aplicación del láser de Er,Cr:YSGG.

En el estudio microbiológico, se han considerado como variables dependientes -que es en la que se mide el efecto esperado de la exposición- las que nos muestran el efecto bactericida obtenido, es decir el índice bactericida o de desinfección y el porcentaje de muerte bacteriana. Las variables independientes, que son las posibles causas del fenómeno objeto de estudio, son los distintos tipos de tratamientos efectuados (Bolúmar 2001) y que siempre mencionaremos con este orden:

-NaOCl 5%

-NaOCl 0.5%

-Láser Er,Cr:YSGG 1W 30'

-Láser Er,Cr:YSGG 2W 30'

-Láser Er,Cr:YSGG 1W 60'

-Láser Er,Cr:YSGG 2W 60'

-Láser Er,Cr:YSGG 1W 120'

4.2.6.1. Introducción de datos

Los datos obtenidos del recuento bacteriano que se ha observado en las placas de Petri, se pasaron a una hoja de cálculo del programa Microsoft Office Excel 2000, incorporándose en 7 tablas diferentes en razón del tratamiento efectuado. En cada una de estas tablas los datos se agruparon en una serie de columnas cuyo contenido era:

Primera columna: Valor numérico -en forma exponencial- del recuento bacteriano de los dientes control de inoculación.

Segunda columna: Valor numérico -en forma exponencial- del recuento bacteriano de los dientes que han recibido el tratamiento específico en cuestión.

En ambos casos, al ser valores de elevada magnitud y con un rango muy amplio, se ha preferido efectuar su transformación en logaritmos de base 10. Esta estrategia es común en este tipo de estudios (Rooney y cols. 1994, Gutknecht y cols. 1996a).

Tercera columna: Valor logarítmico del recuento bacteriano de los dientes control de inoculación.

Cuarta columna: Valor logarítmico del recuento bacteriano de los dientes que han recibido el tratamiento.

Para valorar la actividad bactericida se han empleado dos índices estadísticos que son los que aparecen a continuación:

Quinta columna: Índice bactericida (o de desinfección). Se calcula restando el valor logarítmico del recuento bacteriano de los dientes que han recibido el tratamiento del de los que fueron controles de inoculación.

Este valor obviamente ha de ser siempre positivo, e indica una mayor actividad bactericida cuanto mayor sea.

Sexta columna: Tasa de supervivencia bacteriana. Este índice se calcula dividiendo el valor numérico del recuento bacteriano de los dientes que han recibido el tratamiento, multiplicado por 100, por el valor numérico del recuento bacteriano de los dientes control de inoculación. El resultado se expresa en tantos por ciento. No obstante, este índice no se ha aprovechado y sí el que se ha obtenido a partir de él y que es el que se expone a continuación.

Séptima columna: Porcentaje de reducción bacteriana. Se obtiene restando de 100 la tasa de supervivencia bacteriana, y el resultado también se expresa en tantos por cien.

Octava columna: indica el número del experimento.

4.2.6.2. Estrategia de análisis

Tras verificar los datos de la hoja de cálculo Excel, lo que permitió hacer un análisis inicial de los mismos, éstos se volcaron al paquete estadístico SPSS- versión 11 para su tratamiento estadístico. Éste se ha efectuado de la siguiente manera, para cada uno de los dos índices estudiados (porcentaje de muerte bacteriana e índice bactericida):

1. Análisis exploratorio de los datos

Se ha seguido esta sistemática (Doménech y Granero 2000b):

-Información sobre la distribución de frecuencias: El procedimiento EXAMINE del Sistema SPSS permite, gracias a los diagramas de tallo y hojas, y a los histogramas, tener un conocimiento gráfico inicial sobre la distribución de frecuencias.

-Descripción basada en momentos: El mismo procedimiento EXAMINE proporciona todos los estadísticos necesarios para poder hacer esta descripción en la que se representan las medidas de tendencia central, de dispersión u homogeneidad, de asimetría y de apuntamiento.

-Descripción basada en ordenaciones: Como medidas basadas en ordenaciones se utilizó la descripción de los percentiles (por los métodos "Average" y de Tuckey) así como la relación de los valores extremos.

Además se dispuso de un gráfico donde manera conjunta podían examinarse todos los diagramas de caja correspondientes a los distintos tratamientos.

Todos estos estadísticos se han obtenido con el procedimiento EXAMINE del Sistema SPSS.

-Comprobación de la Normalidad y de la homogeneidad de variancias: Para la comprobación de la Normalidad se dispuso de la información proporcionada por los gráficos Q-Q Normal Plot y Detrended Normal Plot del procedimiento EXAMINE; la verificación se obtuvo tras los tests de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk.

La homogeneidad de variancias se verificó mediante el test de Levene (procedimiento ONEWAY).

2. Análisis de la relación entre variables

Se hizo mediante:

-Comparación entre medias: Se efectuó en primer lugar un análisis de la variancia (ANOVA) mediante el procedimiento ONEWAY del sistema SPSS y asimismo la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en este caso con el procedimiento NPAR TEST K-W.

-Comparaciones entre grupos: Los contrastes (por el método LSD) se obtuvieron gracias a la instrucción POSTHOC del procedimiento ONEWAY del Sistema SPSS.

En todos estos análisis de relación entre variables se consideraron como valores de p estadísticamente significativos los iguales o inferiores a 0.05.

