

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias de Salud**

**Determinación de los microorganismos que se encuentran dentro de la congregación del  
biofilm bacteriano de tratamientos Endodóncicos**

**Laura Gabriela Sisa Caiza**

**Odontología**

Trabajo de integración curricular presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Odontólogo

Quito, 18 de diciembre de 2019

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias de Salud**

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**Determinación de los microorganismos que se encuentran dentro de la congregación del  
biofilm bacteriano de tratamientos Endodóncicos**

**Laura Gabriela Sisa Caiza**

**Calificación:**

**Nombre del profesor, Título académico:**

Johanna Monar, Dra.

**Firma del profesor:**

---

Quito, 18 día de diciembre de 2019

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Laura Gabriela Sisa Caiza

Código:

00111915

Cédula de identidad:

1600474587

Lugar y fecha:

Quito, 18 diciembre de 2019

## RESUMEN

En la actualidad una de las etiologías principales para el fracaso de los tratamientos endodóncicos es la persistencia bacteria en el sistema de conductos radiculares. Los microorganismos bucales juegan un papel crucial, para predecir el éxito o el fracaso de la endodoncia. Por lo tanto, debemos entender los mecanismos de los cuales se basan los microorganismos para poder sobrevivir en un medio tratado con el sistema de desbridamiento y sistema químico. Comprender su mecanismo de sobrevivencia en un medio modificado. Sin embargo, el porcentaje de éxito se ve afectado por microorganismos bacterianos causando así infecciones secundarias y persistentes. Siendo esto, un reto de la Endodoncia moderna, lo que conlleva a la búsqueda de una sinergia tanto de la técnica manual y la técnica química con el láser u otras sustancias química empleadas en Odontología.

Palabras clave: Endodoncia, *Enterococcus faecalis*, Hipoclorito de sodio, Pulpitis, Periodontitis Apical, Bacterias persistentes, PBS

## ABSTRACT

Currently one of the main etiologies for the failure of endodontic treatments is the bacterial persistence in the root canal system. Oral microorganisms play a crucial role in predicting the success or failure of endodontics. Therefore, we must understand the mechanisms on which microorganisms are based in order to survive in a medium treated with the debridement system and chemical system. Understand its survival mechanism in a modified environment. However, the success rate is affected by bacterial microorganisms thus causing secondary and persistent infections. This being a challenge of modern endodontics, which leads to the search for a synergy of both manual technique and chemical technique with laser or other chemicals used in Dentistry.

*Key words:* Endodontics, *Enterococcus faecalis*, Sodium hypochlorite, Pulpitis, Apical Periodontitis, Persistent Bacteria, PBS

## Tabla de Contenidos

1	INTRODUCCIÓN.....	9
1.1	Planteamiento del problema.....	9
<b>1.2</b>	<b>Justificación .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>11</b>
1.3.1	<b>Objetivo general .....</b>	<b>11</b>
1.3.2	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>11</b>
2	MARCO TEÓRICO .....	12
<b>2.1</b>	<b>Histología dental.....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Esmalte.....	12
2.1.2	Dentina.....	12
<b>2.1.3</b>	<b>Tejido Pulpar.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Tejido periodontal.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Patologías dentales .....</b>	<b>15</b>
2.2.1	<b>Caries .....</b>	<b>15</b>
2.2.2	<b>Patologías dentales .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Biofilm bacteriano.....</b>	<b>18</b>
2.3.1	<b>Concepto .....</b>	<b>18</b>
2.3.2	<b>Formación del biofilm.....</b>	<b>19</b>
2.3.3	<b>Vías de invasión.....</b>	<b>19</b>
2.3.4	<b>Microbiota de dientes endodonciados .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Resistencia bacteriana .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Métodos de eliminación bacteriana intraconducto .....</b>	<b>24</b>
2.5.1	<b>Principios de la limpieza.....</b>	<b>24</b>
2.5.2	<b>Irrigantes .....</b>	<b>24</b>
2.5.3	<b>Láser en odontología.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Endodoncia .....</b>	<b>28</b>
2.6.1	<b>Preparación mecánica y desinfección química .....</b>	<b>28</b>
2.6.2	<b>Obturación final .....</b>	<b>29</b>
<b>2.7</b>	<b>Preparación de muestras .....</b>	<b>29</b>
2.7.1	<b>Solución buffer .....</b>	<b>29</b>
<b>2.8</b>	<b>Observación de muestras.....</b>	<b>30</b>

<b>2.8.1</b>	<b>Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)</b> .....	30
<b>2.8.2</b>	<b>Agar Bilis esculina con Azida</b> .....	30
<b>3</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Tipo de estudio</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Muestras</b> .....	<b>31</b>
3.2.1	Criterios de inclusión .....	31
3.2.2	Criterios de Exclusión.....	31
3.2.3	Grupo experimental.....	31
<b>3.3</b>	<b>Materiales</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4</b>	<b>Procedimiento</b> .....	<b>33</b>
3.4.1	Obtención de la muestra.....	33
3.4.2	Preparación bacteriana .....	33
3.4.3	Preparación de la muestra .....	33
3.4.4	Infección de los conductos radiculares .....	34
3.4.5	Identificación de bacterias .....	34
3.4.6	Observación de Biofilm .....	34
<b>3.5</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>36</b>

**ÍNDICE DE TABLA**

Tabla 1. 1 Grupos experimental de las muestras de incisivos humanos. ....	31
---	----

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Planteamiento del problema

La persistencia bacteriana en los conductos radiculares es una de las etiologías principales para el fracaso de los tratamientos endodóncicos, la misma que forma una congregación o aglomerado bacteriano. Las bacterias juegan un papel crucial e importante, para determinar el éxito o el fracaso del tratamiento. Por lo tanto, debemos entender los mecanismos de los cuales se basan los microorganismos para poder sobrevivir en un medio tratado con el sistema de desbridamiento y sistema químico (Schirrmeister, et al., 2007).

Todo el proceso de afectación de los conductos radiculares empieza con la desmineralización del tejido dentario interno a causa de la caries dental, cuyos productos bacterianos llegan a afectar al sistema pulpar y periapical desembocando en una pulpitis irreversible y periodontitis. En contexto, se entiende que la periodontitis apical es una enfermedad infecciosa producida por microorganismos que se albergan en el sistema del conducto radicular, los mismos que tienen que ser tratado mediante la limpieza meticulosa, la conformación y desinfección del canal (Siqueira & Rôes, Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures, 2008).

El tratamiento endodóncico aún puede fallar en algunos casos, y las causas del resultado no exitoso están relacionado principalmente con la permanencia bacteriana en el canal apical en áreas no afectadas por los procedimientos de tratamiento. De igual forma, la capacidad de adaptación de los microorganismo para sobrevivir a los cambios ambientales del conducto radicular.

En un artículo realizado por Williamson et al, menciona que han identificado la predominancia de *Enterococcus faecalis* como una de las especies persistente en los conductos radiculares previamente tratado (Williamson, Cardon, & Drake, 2009)

Stuart et al, en su estudio realizado describe la capacidad de *E. faecalis* para adaptarse a los cambios ambientales modificados después del tratamiento de los conductos radiculares y que su eliminación es muy difícil (Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006).

Mediante este trabajo revisión bibliográfica se pretende analizar que microorganismo o microorganismos están involucrado en el biofilm bacteriano pos tratamiento y su persistencia en los conductos radiculares. De igual forma, se va tratar sobre las características morfológicas y estructurales del biofilm. Además, se pretenden conocer sobre su nivel de resistencia y establecer una comparación entre los irrigantes endodóncicos y sus técnicas de aplicación clínica actual.

## **1.2 Justificación**

La práctica endodóncica mantiene una estrecha relación con la microbiología patógena del medio bucal. Y la causa más frecuente de patología pulpar es la infección oral (Sirvent & García, Concepto de infección en Endodoncia, 2010)

Se postula en varios estudios sobre las causas de fracaso de muchos tratamientos de conductos correctamente obturados es el biofilm bacteriano patógeno. Adicional a esto, se ha comprobado que es un tipo de infección odontológica difícil de erradicar del sistema de conducto, debido a identidades microbianas que son persistentes en el medio radicular (Costerton, y otros, 1994) (Yan, Xiaoqiong, Dongjia, Yanhuo, & Zhongchun, 2016).

En la actualidad, la erradicación bacteriana es un reto para la Endodoncia. El objetivo de este trabajo investigativo es determinar cuáles son los microorganismos persistentes post tratamiento endodónico. Además, conocer el papel del biofilm en Endodoncia, es decir, la estructura, metabolismo y mecanismo de acción, formación del biofilm y vías de invasión bacteriana. Por otro, determinar que irrigantes y métodos, y tratamientos se pueden emplear para un mayor control y eliminación del biofilm bacteriano persistente.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar a través de una experimentación in vitro los microorganismos que se congregan dentro del biofilm bacteriano, en dientes humanos.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar el espesor de la biopelícula formada de cada grupo mediante CLSM (escaneo 3D) y establecer una comparación en la biopelícula.
- Determinar a través de pruebas de sensibilidad (difusión de agar) cuáles son las bacterias que han formado biofilm dentro de los conductos.
- Describir teóricamente las características morfo-funcionales y estructurales del biofilm presente en los conductos radiculares.

### **1.4 Hipótesis**

La bacteria *Enterococcus faecalis* es la espécimen que forma una biopelícula estable, densa y es el patógeno persistente en todos los grupos experimentales formando.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Histología dental

El conjunto de tejidos dentarios y para dentarios está conformado por el esmalte, dentina y cemento, y la pulpa y periodonto (Barrancos & Barrancos, 1999).

#### 2.1.1 Esmalte

El esmalte, es el tejido más duro, con tonalidad de blanco o gris azulado. Tiene capacidad de reacción biológica debido a su abundante cantidad de minerales y poca materia orgánica. Recubierto principalmente por hidroxiapatita, componente principal del esmalte, de dimensiones grandes (Friedman, 2003). La composición de los cristales (hidroxiapatita) puede variar, se encuentran en la superficie y contienen flúor, hierro, estaño, cinc y otros elementos. Los ameloblastos son los que originan el esmalte, empieza el proceso de producción en el límite amelodentinario y sigue hacia la superficie, para predecir el tamaño y la forma del diente. Además, la dureza se debe al constante flujo y exposición de la saliva con la precipitación de las sales de calcio y fosforo, flúor (Barrancos & Barrancos, 1999) (Friedman, 2003).

#### 2.1.2 Dentina

Es un tejido mineralizado y de mayor extensión estructural. Tejido conjuntivo a vascular mineralizado, conformado por túbulos dentinarios. A nivel coronal, se encuentra revestido por esmalte y a nivel radicular por el cemento. Internamente, la dentina está recubriendo la cámara pulpar, que a su vez contiene al tejido pulpar. Los odontoblastos son las células que dan origen a la dentina (Barrancos & Barrancos, 1999) (Friedman, 2003).

La dentina contiene en promedio un 70% de sustancia inorgánica, 12% de agua y un 18% de sustancia orgánica; su composición varía con la edad del individuo y el área del tejido dentinario. La sustancia inorgánica es la parte mineral y está constituida por cristales de hidroxiapatita, cuya

longitud es de 60 nm (nanómetros), es decir, más pequeños que los del esmalte (Friedman, 2003). Carbonatos, sulfatos de calcio y elementos como flúor, hierro, cobre se encuentran en pequeñas cantidades siendo parte de la composición de la dentina. Alrededor del 91 % es colágeno tipo I (sustancia orgánica), estructuralmente está formado por fibrillas, que la unión de las mismas forman fibras. Conformada también por cantidades mínimas de polisacáridos, lípidos y proteínas no colágenas, como la fosforina dentinaria (DPP) (Trowbridge & Kim, 1999). Además, proteoglicanos y glicosaminoglicanos, estos poseen y le otorgan a la dentina elasticidad y flexibilidad, para evitar fracturas del esmalte (Friedman, 2003).

La dentina es un tejido vital y que es capaz de reaccionar frente a estímulos fisiológicos y patológicos causados por bacterias. Como resultado se tiene la formación dentina terciaria o modificando. De acuerdo, a lo expuesto tenemos tres tipos de dentina:

- Dentina primaria: se forma en mayor cantidad, y se deposita durante la odontogénesis hasta la erupción dental (Friedman, 2003).
- Dentina Secundaria o dentina fisiológica, su formación es después que se ha completado el proceso de rizogénesis y durante la existencia del diente en la cavidad bucal. (Gómez & Campos, 1999) (Friedman, 2003).
- Dentina Terciaria, su formación es consecuencia de las respuestas a los estímulos como caries dental y por diversos procedimientos de restauración dental. Los odontoblastos afectados por los estímulos patógenos son los que dan origen a la dentina terciaria. La formación de la dentina terciaria es proporcional a la intensidad y duración del estímulo patológico para así dar origen a una dentina de buena calidad (Gómez & Campos, 1999)

### 2.1.3 Tejido Pulpar

Es un tejido conjuntivo rico en vasos sanguíneos y brinda sostén a las estructuras celulares, vasculares y nerviosas del diente. Conformada por odontoblastos, fibroblastos y células mesenquimales indiferenciadas. Se describen zonas concéntricas en el tejido pulpar como por ejemplo la copa o zona odontoblástica (capa externa o superficial de la pulpa) se encuentra por debajo de la predentina. Está constituida por los odontoblastos dispuestos en empalizada. Los odontoblastos se encuentran conectados y se da lugar a la transferencia de señales químicas y eléctricas. La zona pobre en células o acelular, se localiza por debajo, es un estrato amplio, denso y conformado por capilares y fibras nerviosas.

Seguido, tenemos la zona rica en células, esta capa es densa y contiene células ectomesenquimáticas indiferenciadas, fibroblastos, macrófagos y linfocitos (Gómez & Campos, 1999).

Las células ectomesenquimáticas indiferenciadas son capaces de producir una matriz de colágeno, lo que sirve como suplentes funcionales en la regeneración de células odontoblásticas. Tienen su cargo la producción de dentina terciaria reparadora. Por último, tenemos la zona de pulpa propiamente dicha, es una matriz de proteína disforme que se encuentra rodeada de fibras colágenas. Además, contiene a vasos sanguíneos y nervios que salen de los nervios principales y penetran a través del foramen del ápice dental (Gómez & Campos, 1999) (Friedman, 2003) (Barrancos & Barrancos, 1999).

Las principales funciones de la pulpa son: formadora, crea los diferentes tipos de dentina. Da nutrición, por medio de la transferencia de sustancia fundamental para la función metabólica, de mantenimiento celular y de la matriz orgánica. La pulpa transmite la respuesta dolorosa aferente y respuesta propioceptiva en presencia de estímulos patológicos. Y cumple la función de

protección, y de respuesta a estímulos productores de inflamación.(Schwartz, Summitt, & Robbins., 1999)

#### **2.1.4 Tejido periodontal**

El tejido periodontal es todos aquellos tejidos que rodean al diente. Su principal función es dar sostén y protección al diente. Su amplitud es de 0,5 mm. Cuando existe la invasión bacteriana, se origina proceso inflamatorio a nivel periodontal y esto ocasiona un ensanchamiento del ligamento periodontal. En el periodonto encontramos colágeno tipo I y está inervado por vasos sanguíneos y tiene la capacidad de amortiguar las fuerzas de masticación. (Burns & James, 1999).

El hueso alveolar, es un tejido duro. Este tipo de hueso presenta tres tablas óseas: las placas corticales, la esponjosa, y la alveolar. Da soporte y sostén a los dientes. Por último, la encía, es un tejido o epitelio plano pluriestratificado. Brinda protección externa y es resistente. Internamente se encuentran fibras de colágeno I (Burns & James, 1999).

## **2.2 Patologías dentales**

### **2.2.1 Caries**

La caries dental es la enfermedad crónica más extendida en el mundo y constituye un reto importante en salud pública. (Federación Dental Internacional, 2015). La caries dental se produce por el consumo excesivo de azúcares los mismos que son consumidos por las bacterias bucales y por un proceso de desmineralización de la superficie del esmalte, se produce la aparición de manchas blancas, un signo de inicio de caries (Organización Mundial de la Salud, 2018).

## 2.2.2 Patologías dentales

### 2.2.2.1 *Pulpitis*

Con el avance gradual de la caries, y cuando la misma no ha sido tratada, se llega a tener la afectación de los componentes internos, es decir, la dentina y pulpa. Dentro de las patologías pulpares, tenemos que comprender la diferencia entre:

- Pulpa sana: sin síntomas y pruebas de sensibilidad normales (Glickman, 2009).
- Pulpitis reversible. Pulpa puede ser saneada cuando se retira el agente que provoca la inflamación (Glickman, 2009).
- Pulpitis irreversible sintomática: el tejido pulpar carece de capacidad de regeneración. Presencia de dolor ante estímulos de calor o frío, y presencia de dolor (Glickman, 2009).
- Pulpitis irreversible asintomática: tejido pulpar vivo, presencia de síntomas clínicos. La carie es el agente agresor, ya sea por caries extensas o accidentes traumáticos (Glickman, 2009).
- Necrosis pulpar: hay muerte pulpar y sin respuesta ante pruebas de frío o calor (Glickman, 2009).

### 2.2.2.2 *Patologías periapical*

Los tejidos periorales, son los que proporcionan sostén y están conformados por el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Los cuales son afectados por los procesos cariosos.

Y a nivel periodontal, las patologías que se presentan son:

- Periodontitis apical sintomática:

El tejido periodontal responde a estímulos de dolor y a pruebas de percusión o palpación. Existe presencia de una área radiolúcida apical (Glickman, 2009)

- Periodontitis apical sintomática:

Se inicia con la inflamación y se puede relacionar con una zona radiolúcida apical (Glickman, 2009).

- Periodontitis apical asintomática:

Hay la presencia de inflamación y destrucción del periodonto apical, es etiología pulpar, aparece como un área radiolúcida apical, y sin síntomas clínicos (Glickman, 2009).

- Absceso apical agudo

Presenta inflamación causada por la agresión pulpar y necrosis que avanza rápidamente. Existe dolor espontáneo, sensibilidad a la palpación, presencia de exudado purulento e inflamación adyacente

(Glickman, 2009).

- Absceso apical crónico

Respuesta inflamatoria por causa pulpar, muerte pulpar caracterizada por su aparición progresiva, hay poco o ningún dolor, el exudado o pus se da a través de absceso periapical (Glickman, 2009).

- Osteítis condensante

Presenta una sombra radiopaca difusa, de carácter óseo localizada hacia apical del diente afectado (Glickman, 2009).

## **2.3 Biofilm bacteriano**

### **2.3.1 Concepto**

El biofilm es la conformación de una congregación o comunidad de organismos de distintas variedades, las cuales se encuentran alojadas en una matriz de polisacáridos y adheridas a las superficies internas. Las bacterias patógenas son causantes de los procesos infecciosos en toda la cavidad bucal. Los microorganismos colonizados en los conductos radiculares se mantienen en procesos dinámicos, químicos y físicos, y cuyas especies van a depender de la nutrición disponible, niveles de oxígeno, pH local (Yan, Xiaoqiong, Dongjia, Yanhuo, & Zhongchun, 2016) (Zambrano de la Peña, Salcedo, Petkova, & Ventocilla, 2016).

Varios estudios señalan que el biofilm bacteriano es un mecanismo de adaptación y sobrevivencia en un entorno nuevo. (Costerton, et al., 1994) Esta asociación de microorganismos puede ser variada, ya sea especies de una misma familia o de distinto género (Costerton, et al., 1994).

Como resultado de lo ya mencionado se tiene una auto agregación y una coagregación, respectivamente. La coagregación se entiende que es un biofilm más complejo y difícil de eliminar, debido a que por ser variada tienden a unirse para compartir diferentes mecanismos de protección contra su eliminación, con el fin de preservar la comunidad bacteriana (Zambrano de la Peña, Salcedo, Petkova, & Ventocilla, 2016).

Por otro lado, el biofilm también se considera como un ecosistema patógeno de carácter proliferante y con metabolismo enzimático activo. Van a unirse a superficies inertes, tanto biológicas como sintéticas. Con predilección por tejidos necróticos. (Zambrano de la Peña, Salcedo, Petkova, & Ventocilla, 2016)

Según Leonardo y colaboradores, es su estudio, postula que el Biofilm bacteriano apical es clínicamente importante debido a que estos microorganismos son altamente resistentes a los antimicrobianos. No es suficiente la preparación biomecánica para su eliminación, lo que resulta en la falla del tratamientos endodóncico como resultado de la persistencia bacteriana (Leonardo, Rossi, Sil-va, & Ito, 2002)

### **2.3.2 Formación del biofilm**

La síntesis de biofilm en el sistema radicular, no es muy estudiado pero se basa en una teoría postulada a través de un estudio realizado por Svensäter y Bergenholtz, el cual se base en etapas. En la etapa inicial, se forma una película adquirida y adhesiva que va a localizarse en la dentina, y es originado por el alojamiento proteico y sumado otros elementos derivados de las bacterias del medio, lo que desarrolla necrosis e inflamación tisular. La etapa intermedia, se tiene que la misma película adhesiva se coloniza algunas bacterias con capacidad adherente. Como etapa final, en la biopelícula ya adherida, se da la segregación de mediadores que van a fijar aún más bacterias diversas y van a formar la matriz extracelular proteica teniendo así la primera barrera de protección (Svensäter & Bergenholtz, 2005).

El biofilm formado va a madurar y a crear sistemas de defensa más complejos. Y como resultado se tiene que la enfermedad se convierte en crónica al igual que la respuesta inflamatoria del huésped (Zambrano de la peña, Salcedo, Petkova, & Ventocilla, 2016).

### **2.3.3 Vías de invasión.**

El complejo pulpar es un tejido estéril, aisladas de los microorganismos por los tejidos duros, que son capas protectoras (esmalte y cemento). Existen situaciones por las cuales se pierda la integridad de los tejidos duros, ya sea por caries, fracturas, traumatismo, grietas, el desgaste o la abrasión. La pulpar expuesta en el medio oral, corriendo así el riesgo de infecciones y

colonización bacteriana. La principal vía de ingreso de las bacterias son los canales dentinarios. (Siquiera & Rocas, 2010).

Cerca del complejo pulpar los túbulos dentinarios son más permeables, por ende los túbulos dentinarios poseen mayor diámetro y densidad. En dientes vitales y no vitales existe un diferente grado de invasión microbiana. En piezas no vitales, hay mayor permeabilidad, de esta forma las bacterias se colonizan mucho más rápido. Lo que no pasa con piezas vitales, en este caso, el exudado dentinario y el sustrato tubular afecta a la permeabilidad y pueden retrasan la colonización (Siquiera & Rocas, 2010).

Cuando se da una exposición pulpar, el tejido pulpar está directamente expuesto a los microorganismos embebidos en la saliva. La pulpa se inflama por todo el proceso carioso, se necrosa y se infecta internamente (conductos radiculares). Este proceso puede ser impredecible y lento (Siqueira & Rôças, Community as the unit of pathogenicity:emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis., 2009) (Siquiera & Rocas, 2010). (Liébana, 2002)

#### **2.3.4 Microbiota de dientes endodonciados**

Mediante estudios microbiológicos realizados se ha podido conocer distintos microorganismos patógenos endodóncicos, y a través de estudios moleculares se ha podido confirmar su existencia e identificación (Siquiera & Rocas, 2010).

En la actualidad se ha comprobado que la mayoría de los dientes con tratamientos endodóncicos tiene secuelas permanentes de periodontitis apical dando como resultado una infección del sistema de conductos radiculares (Siqueira & Rôes, Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures, 2008). Estos patógenos son considerados como ‘persistentes’ ya que han sobrevivido a los efectos del sistema de

desbridamiento o por defecto de la técnica de obturación como consecuencia de una infiltración coronar la misma que se entiende como una infección intrarradicular secundaria o persistente (Siquiera & Rocas, 2010).

En ocasiones, un tratamiento antimicrobiano no elimina totalmente los microorganismos patógenos, lo que se genera una congregación selectiva de bacterias resistentes. Las bacterias gramnegativas son las causantes de las infecciones primarias, es decir las que dan origen a las infecciones endodóncicas; cuando se realiza el tratamiento de conductos, estas son las primeras en eliminarse o desaparecer. (Yan, Xiaoqiong, Dongjia, Yanhuo, & Zhongchun, 2016).

En números estudios enfocados en el tema de Endodoncia, concluyen que existen un mayor número de bacterias grampositivas. Las bacterias que están presentes con mayor frecuencia son incluidos estreptococos, *Parvimonas micra*, especies de *Actinomyces*, lactobacilos, especies de *Propionibacterium* y *Enterococos* (Yan, Xiaoqiong, Dongjia, Yanhuo, & Zhongchun, 2016).

Varios estudios han indicado que *Enterococcus faecalis* es la bacteria más frecuentemente encontrada en los conductos radiculares. Son los promotores de la enfermedad persistente y tiene la capacidad de adaptación en ambientes severos, entre estos tenemos un pH alcalino extremo, concentraciones de sal, privación de nutrición y antimicrobianos (Yan, Xiaoqiong, Dongjia, Yanhuo, & Zhongchun, 2016) (Schirrmeister, et al., 2007) (Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006).

*E. faecalis* (coco grampositivo y anaerobio facultativo) se encuentra en un 90% de los dientes endodonciados (Siqueira & Rôças, Community as the unit of pathogenicity:emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis., 2009). Una especie que con frecuencia habita en el ambiente desnutrido de los canales radiculares y depende no solo de su propia propiedad sino que trabaja en conjunto

con otras especies en la biopelícula. En la actualidad, las interacciones entre las diversas especies del biofilm endodónico no se conocen con claridad y se requiere de más información sobre las interacciones ellas (Yan, Xiaoqiong, Dongjia, Yanhuo, & Zhongchun, 2016) (Sundqvist, Figdor, Persson, & Sjögren, 1998).

Yan, et al en el 2016, mediante un ensayo de inanición entre especie duales, en el cual se estableció cuatro modelos de doble especie, la *E. faecalis* y *C. albicans* (EC), *E. faecalis* y *S. gordonii* (ES), *E. faecalis* y *A. viscosus* (EA), y *E. faecalis* y *L. acidophilus* (EL); se pudo evidenciar como resultados finales que el *E. faecalis* generó una mayor resistencia a inanición en presencia de *C. albicans*, *S. gordonii*, *A. viscosus*, y *L. acidophilus* que solo después de 4 días, y ambos mostraron signos diferencias significativas. Además, La convivencia de *C. albicans* mejoró la supervivencia de *E. faecalis* en condiciones de inanición. En contexto, *E. faecalis* y *S. gordonii* y *E. faecalis* y *A. viscosus* formó una biopelícula bastante gruesa y densa, y un gran número de cocos cubrieron la dentina del conducto radicular (Yan, Xiaoqiong, Dongjia, Yanhuo, & Zhongchun, 2016).

Sundqvist et al en un estudio realizado, concluyeron que la flora microbiana era principalmente de una sola especie de organismos predominantemente (Gram positivos). Los aislamientos más comúnmente recuperados fueron bacterias de la especie *Enterococcus faecalis* (Sundqvist, Figdor, Persson, & Sjögren, 1998).

## **2.4 Resistencia bacteriana**

La resistencia bacteriana en endodoncia es una característica fundamental de los microorganismos patógenos (Sirvent & García, Biofilm. Un nuevo concepto de infección Endodoncia en Endodoncia, 2010).

Existen varias formas que favorecen a su permanencia en los conductos radicular. La morfología radicular influye mucho en esta capacidad, ya que existen áreas de difícil acceso para los irrigantes y el sistema manual de limas. El sistema de canal radicular es complejo y único en cada diente. En cada conducto radicular se encuentran conductos accesorios o laterales, estos son ramificaciones laterales del conducto que forman una comunicación entre la pulpa y el periodonto. Estas pueden estar localizadas a cualquier sitio de lo largo de la raíz, pueden encontrarse a nivel de la bifurcación y el ápice y con incidencia alta en tercio apical de dientes anteriores y posteriores. Se encuentran llenos de tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. No tienen un aporte de circulación colateral y a penas contribuyen a la función pulpar (Torabinejad & Walton, 2010). Según Walton y Vertucci, estos conductos no llegan a ser desbridados durante la limpieza y la conformación radicular, lo que repercute en el resultado del tratamiento endodóncico (Burns & James, 1999) (Torabinejad & Walton, 2010).

En la formación de biofilm, se tiene una matriz de polisacáridos (barrera fisicoquímica). Esta barrera evita el ingreso de agentes del medio externo, evitando así el cambio de pH del ambiente bacteriano. Esto proporciona la supervivencia bacteriana y garantiza su permanencia; siendo este uno de los mecanismos más importantes de resistencia (Clegg, Vertucci, Walker, Belanger, & Britto, 2006) (Costerton J. , 2001).

Todo el producto enzimático generado por película bacteriana, permite la adhesión a otros sustratos y de otros patógenos. El ralentizando el gasto de nutrientes, es una forma de economizar. Además, el nivel de división bacteriana del biofilm es deficiente, lo que causa que los antibióticos bacteriostáticos transgreden en la división celular (Sirvent & García, Biofilm. Un nuevo concepto de infección Endodoncia en Endodoncia, 2010) (Clegg, Vertucci, Walker, Belanger, & Britto, 2006).

El Biofilm tiende a engañar o distraer al mecanismo de defensa del huésped, mediante el desprendimiento paulatino de bacterias. Al existir la presencia patógena, el sistema de defensa celular interviene y las eliminan pero no en sí las bacterias del sitio de origen. Lo que va a convertir el proceso en algo crónico y produce sintomatología en el huésped (Sirvent & García, Biofilm. Un nuevo concepto de infección en Endodoncia en Endodoncia, 2010) (Costerton J. , 2001).

Por otro lado, las bacterias grampositivas poseen una pared celular mucho más simple en sus componentes y luce como una estructura compuesta por una sola capa. Esta capa está compuesta por péptidoglicano, la cual es mucho más gruesa con tasa alta de enlaces cruzados; lo que le da estabilidad y resistencia ante agente antibacterianos e irrigantes.

## **2.5 Métodos de eliminación bacteriana intraconducto**

### **2.5.1 Principios de la limpieza**

El tratamiento endodóncico conservador representa un método predecible para conservar un diente en la cavidad bucal (Johnson & Craig, 2010). Como parte de todo el tratamiento, existen factores que influyen en este proceso y son la anatomía y morfología interna, los instrumentos e irrigantes disponibles. Para poder realizar el desbridamiento del conducto radicular, el instrumento debe estar en contacto y cepillar las paredes del mismo. Entre los factores morfológicos tenemos los conductos laterales, y accesorios, la curvatura de los conductos, las irregularidades de sus paredes. Estos prácticamente impiden el desbordamiento completo de los conductos. Por consiguiente, el objetivo de la limpieza es eliminar por complejos los factores irritantes, pero no eliminarlos totalmente (Johnson & Craig, 2010) (Torabinejad & Walton, 2010).

### **2.5.2 Irrigantes**

Cabe recalcar que los conductos radiculares no tienen conformación cilíndrica y regular. Sin embargo, se requiere realizar la descontaminación a través de irrigantes para mantener libre de bacterias los conductos radiculares (Torabinejad & Walton, 2010).

Los irrigantes en endodoncia son sustancias y/o soluciones químicas que tienen como objetivo la eliminación bacteriana, limpiar la dentina infectada, y al tejido pulpar necróticos y residuos generados por la acción mecánica de la instrumentación manual (Lasala, 2012).

#### 2.5.2.1 *Hipoclorito sódico*

Es uno de los irrigantes más usados y comunes. Su fórmula química es NaOCl. Este producto permite la limpieza mecánica y disolver el tejido vivo y necrótico, suprime los microorganismos presentes y funciona como lubricante del conducto. En el tejido necrótico, el hipoclorito rompe las proteínas en aminoácidos. La concentración recomendada en endodoncia oscila entre 0.5 % y el 5.2 %, pero en si la dosis recomendada y que aún guarda su actividad antimicrobiana es de 2.5 % siendo esta menos tóxica. (Torabinejad & Walton, 2010) (Johnson & Craig, 2010). (Cullen, Wealleans, Kirkpatrick, & Yaccino, 2015)

#### 2.5.2.2 *Clorhexidina*

Es una sustancia con amplia actividad microbiana, de acción duradera y menos tóxica. Viene en menor concentración, pero tiene igual efectividad como el hipoclorito sódico. Sin embargo, tiene una desventaja, ya que su incapacidad para disolver el tejido necrótico ni eliminar el barrido dentinario, lo que puede significar un inconveniente en su uso clínico.

En un estudio de laboratorio realizado por Oncag et al, concluyeron que el uso de gluconato de clorhexidina al 2% y la cetrexidina fueron más efectivos en *E. faecalis* que el NaOCl al 5,25% a los 5 minutos. De manera similar, el gluconato de clorhexidina al 2% y la cetrexidina tuvieron

resultados más efectivos en microorganismos anaerobios que el NaOCl al 5,25% a las 48 h. (Onçağ, et al., 2003)

### 2.5.2.3 EDTA

El EDTA es conocido como sustancia que permite abrir los canales radiculares, empleado en el protocolo de irrigación final en tratamiento endodóncico, con el objetivo de eliminar el tejido inorgánico, es decir eliminar la capa mineralizada del barrido dentinario, dejando así intacto los elementos tisulares orgánicos. Además, posee una actividad antimicrobiana (Johnson & Craig, 2010).

### 2.5.3 Láser en odontología

La evolución e innovación humana permitió no solo conocer los secretos de la forma de energía sino sobre todo el poder emplearla en el campo de la salud. (Maggioni, T, & Scarpelli, 2009). El láser, se entiende como la amplificación de la luz mediante el fenómeno de la emisión estimulada de radiación. Existen varios tipos de láser, y algo en común que tiene es que emiten energía luminosa a longitud de onda única. Se clasifican de acuerdo a su medio activo, según la longitud de onda, forma de emisión. Sin embargo, su principal y común clasificación es acorde a la potencia en la que van a ser usados. De acuerdo, a la potencia tenemos dos tipos grandes de láseres:

- Láser de baja potencia.
- Láser de alta potencia.

El láser de baja potencia es empleado en el control del dolor y como antiinflamatorio por tener capacidad bioestimulante. Por otro lado, el láser de alta potencia generan efectos físicos

visibles, por lo cual es empleado como una herramienta de corte, es decir un reemplazo al bisturí convencional (Pearson & Schuckert, 2003) (Maggioni, T, & Scarpelli, 2009).

El uso del láser para la detección de caries y su empleo en la operatoria ha llevado a otro nivel, el uso del mismo. Una de las ventajas, es su actividad antimicrobiana (Maggioni, T, & Scarpelli, 2009). Las radiaciones láser tienen un efecto bactericida ya que causa mutaciones a nivel de las paredes celulares de las bacterias. Debido a sus mecanismo de dispersión y los fenómenos de refracción y reflexión (Pearson & Schuckert, 2003) (España, J, Berini, & Gay-Escoda, 2004). La posibilidad de usar laser esta relaciona con la posibilidad de conducir el rayo, sobre fibras ópticas de pequeños diámetros en capacidad de ser incluidas como instrumento intrarradicular en el conducto (Maggioni, T, & Scarpelli, 2009). La radiación de neodimio se extiende por 1.10 um, en el interior de los túbulos dentinarios, estos rayos alcanzan aquellas zonas bacterianas que no alcanza los irrigantes químicos. Como resultado final se obtiene un 98.5 % de grado de desinfección, cuando se aplica la fuente láser; siendo este uno de los objetivos principales del tratamiento endodóncico (Maggioni, T, & Scarpelli, 2009). Por otro lado, el láser de Diodo tiene similitud con el láser de neodimio y su modo de aplicación es por medio de fibra óptica. Esta luz emitida traspasa por la dentina logrando así tener una propiedad bactericida con el fin de obtener mejores resultados que con la irrigación habitual. (Kreisler, et al., 2003)

Dentro de todo lo expuesto, el objetivo principal de la endodoncia es tener un tratamiento exitoso con el fin de preservar la unidad dental dentro de la cavidad bucal. El uso de varios irrigantes durante el tratamiento endodóncico funciona en cierto grado pero no es suficiente y debido a esto se tiene que buscar alternativas o sinergias de los irrigantes u otros elementos, para obtener la erradicación de bacterias resistentes. La aplicación del láser de diodo podría ser un

complemento del tratamiento endodóncico convencional cuando se usa en combinación con una solución de NaOCl. O a su vez se podría usar clorhexidina como irrigantes intraconducto y complementar el tratamiento con el sistema de rayos láser Diodo.

## **2.6 Endodoncia**

Es una especialidad o rama de la odontología, que estudia las estructuras morfológicas y fisiológicas internas de los dientes, y a su vez trata las afecciones pulpares y periapicales (Glickman, 2009).

Con los años la odontología ha ido cambiando, bajo el criterio cada vez más conservacionista de la estructura dentaria establece un incremento en la demanda de tratamiento endodóncico. Con el objetivo del que tratamiento sea la conservación dental y que favorezca el éxito. La endodoncia abarca un grupo simultáneo de más especialidades Odontológicas, con el único fin de preservar el diente tanto estructuralmente como los tejidos adyacentes, para así evitar la recidiva de la patología.

### **2.6.1 Preparación mecánica y desinfección química**

La preparación mecánica consiste en que todas las superficies de las paredes del conducto radicular sean desbridadas para lograr la desinfección intrarradicular. Es indispensable tener en cuenta que la sobre instrumentación puede debilitar las superficies radiculares, para ello, la preparación mecánica va apoyada con la irrigación intraconducto, el cual permite la remoción de tejido pulpar contaminado y de detritos. Tanto la preparación mecánica como química permite la conformación ideal de sistema de conductos (Jhohnson & Craig, 2010).

El objetivo de la irrigación química es la desinfección de la superficie. Los irrigantes deben cumplir con criterios que incremente el éxito del tratamiento. Los irrigantes deben ser

antibacterianos, con poder de eliminar bacterias anaerobias. A su vez, ser una solución biocompatible con los tejidos vivos, y tener efecto inactivador de las endotoxinas (Torabinejad & Walton, 2010)

### **2.6.2 Obturación final**

El proceso de la obturación, al que se le conoce como el sellado impermeable de los conductos tiene como fin, evitar la filtración apical y a nivel coronal, después de la conformación de los conductos y la desinfección del mismo. La impermeabilización apical y coronal es primordial para evitar una invasión bacteriana externa y garantizar el éxito endodóncico. El conducto debe cumplir con criterios para dar paso a la obturación, el sistema de conductos debe tener la longitud ideal y completa en su instrumentación, estar asintomático y completamente seco (Jhohnson & Craig, 2010) (Trowbridge & Kim, 1999).

## **2.7 Preparación de muestras**

### **2.7.1 Solución buffer**

El PBS es un buffers usado por ser biocompatible celular e isotónico, se emplea como disolvente de sustancias para cultivos. Además, es un disolvente para métodos de deshidratación de biomoléculas, debido a que las moléculas de agua contenidas en PBS van a adherirse a la biomolécula, lo que genera que estas se inmovilicen una superficie sólida. La capa de agua, generada por la adherencia, evita que se modifique y se desnaturalicen las biomoléculas ocasionando un cambio en la conformación durante el proceso de desecación (Laboratorio de Genómica Viral y Humana, 2008).

## 2.8 Observación de muestras

### 2.8.1 Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)

Es un microscopio, en el cual se pueden observar imágenes a mayor resolución y nitidez, en tercera dimensión (3D) de especímenes biológicos siendo esto un avance en diversas áreas científicas. Su principio es emitir fluorescencia artificial a una longitud de onda determinada. El láser va punto a punto sobre la muestra obteniendo diferentes planos que permiten su análisis en tres dimensiones. El CLSM no es invasivo y la preparación de las muestras es simple ya que no requiere de otros equipos especiales y la mayor parte de las muestras son preservadas (UNNE, 2013).

### 2.8.2 Agar Bilis esculina con Azida

Es un medio selectivo y de rápido crecimiento para aislamiento de colonias para *Enterococcus*. Todas las especies de *Enterococcus*, con excepción de *E. gallinarum*, se evidencia cambios en las reacciones de hidrólisis de esculina pasadas las 24 horas de desarrollo, las mismas que presentan colonias con halos negros alrededor de las misma. De igual forma puede dar lugar a crecimiento de cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, bacterias que poseen características similares en sus colonias, pero se diferencian en le tamaños con los de la especie de *Enterococcus* (Herrera, 199).

Las bacterias del género *Enterococcus* tiene la capacidad de crecimiento en presencia de bilis e hidrolizarla para obtener glucosa y esculina. En ciertos casos, las bacterias de este género son capaces de hidrolizar la esculina, es decir, el paso de la esculina a citrato amónico férrico, dando la característica de un halo marrón negruzco pasa a negro alrededor de las colonias. Por otro lado, la bilis de buey inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas, excepto de los *Enterococos*, mientras que la Azida sódica suprime las bacterias gram negativas (Birtania, 2019).

### 3 METODOLOGÍA

#### 3.1 Tipo de estudio

Este es un estudio experimental, in vitro, comparativo, descriptivo.

#### 3.2 Muestras

En este estudio se van a utilizar 60 incisivos de seres humanos.

##### 3.2.1 Criterios de inclusión

- Dientes
  - Sin caries.
  - Sin restauraciones.
  - Sin fractura.
  - Ápice cerrado.

##### 3.2.2 Criterios de Exclusión

- Dientes:
  - Fracturas verticales.
  - Con conductos calcificados.
  - Cámara calcificada.
  - Con reabsorciones.
  - Ápices abiertos.

##### 3.2.3 Grupo experimental

Los 60 incisivos se van a dividir en 5 grupos al azar.

*Tabla 1. 1 Grupos experimental de las muestras de incisivos humanos.*

Grupo C	Grupo E - C	Grupo E- S	Grupo E- A	Grupo E- L
---------	-------------	------------	------------	------------

12 incisivos Inoculados con <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>A. viscosus</i> y <i>L. acidophilus</i>	12 incisivos Inoculados con <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> ,	12 incisivos inoculados con <i>E. faecalis</i> y <i>S. gordonii</i> ,	12 incisivos inoculados con <i>E. faecalis</i> y <i>A. viscosus</i>	12 incisivos inoculados con <i>E. faecalis</i> y <i>L. acidophilus</i>
---	---	---	--	---

### 3.3 Materiales

- Limas Flexofile de primera seria No. 10, 15 y 20 (Dentsply Maillefer)
- Limas Protaper Manual SX, S1, S2, F1, F2 (Dentsply Maillefer)
- Regla milimetrada para la estandarización de muestras (Dentsply Maillefer)
- Micromotor (NSK)
- Disco de diamante.(STARDENT)
- Tubos de ensayo con agar infusión cerebro-corazón (BHI)
- Placas de Agar Bilis Esculina Azida (OXOID)
- PBS (Phosphate-buffered Saline)
- Suero Fisiológico (Eufar)
- Hipoclorito de Sodio (NaOCl 5.25%)
- Clorhexidina (CHX 2% Lira)
- EDTA 17% (Eufar)
- Cepas de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus* y *Lactobacillus acidophilus*
- Incubadora (Pol-Eko Aparatura)
- Autoclave (Market Forge)
- Puntas de Irrigación NaviTip (Ultradent)
- Jeringas de 3mL (NAPRO)
- Gasas estériles (SANA)

- Conos de papel estériles (VDW/Alfred Betch GMBH)
- Guantes de nitrilo (NIPRO)
- CLSM (Carl Zeiss, modelo Axiovert 135 M)
- Software SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

### **3.4 Procedimiento**

#### **3.4.1 Obtención de la muestra**

Se realizará una petición a las diferentes casas y centros de salud dentales en Tumbaco y Cumbayá, para con la firma del consentimiento informando de los pacientes, donen a esta investigación los incisivos extraídos. Los mismos que serán almacenados en suero fisiológico y recolectado inmediatamente para su preparación.

#### **3.4.2 Preparación bacteriana**

Se procederá a tomar muestras de cada bacteria y se realizará el ajuste de las concentraciones finales de ambas bacterias a  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) / mL. El cultivo bacteriano de cada especie se centrifugará a 5000 rpm a 4 grados por 5 minutos y el sobrenadante será descartado. El depósito bacteriano será lavado una vez con PBS y se sembrará por 24 horas a 35 grados centígrados en agar BHI.

#### **3.4.3 Preparación de la muestra**

Previamente, los dientes serán higienizados utilizando ultrasonido sobre su superficie radicular para el retiro de tejidos duros o blandos. Se tomarán radiografías periapicales de cada espécimen, para determinar y aseverar los criterios de inclusión y exclusión. A los dientes que cumplan con todos los criterios de inclusión se les removerá la corona clínica dejando a todas las muestras con una longitud de 10 milímetros desde el ápice anatómico. El corte se realizará con micromotor con disco de diamante. Seguidamente, se procederá a la instrumentación de los

conductos, la primera etapa manual será con limas 10 y 20K-flexofile a una longitud de trabajo de 0.5mm del foramen. Se proseguirá a instrumentar con limas Protaper manuales hasta la F2. Entre cada cambio de lima se irrigará los conductos de los especímenes con hipoclorito de sodio al 5.25% y EDTA al 17% para eliminar el tejido pulpar. (Yan, Xiaoqiong, Dongjia, Yanhuo, & Zhongchun, 2016).

#### 3.4.4 Infección de los conductos radiculares

Se realizará la inoculación del conducto radicular con las bacterias de doble especie y se conformará en los 4 grupos (EC), (ES), (EA) y (EL) y en el grupo C. Los grupos EC, ES, EA, EL y C serán inoculados en tubos de ensayo, conteniendo 3 mL de caldo BHI, respectivamente, y la concentración final de cada bacteria será de  $10^5$  CFU / mL. Se inocularán doce raíces a cada medio de cultivo bacteriano, los mismos que serán inoculados e incubados a 37°C por 21 días.

#### 3.4.5 Identificación de bacterias

Transcurrido el tiempo establecido, se procederá a tomar muestras de los inóculos con puntas de papel estériles. Para asegurar la biopelícula con las bacterias de interés se enjuagará con PBS, lo que nos ayudará a eliminar bacterias plantónicas y poco adherentes. Las muestras tomadas serán sembradas en medios de agar Bilis Esculina Azida (BEA) e incubadas de 24 a 72 horas a 37 °C para su identificación microbiología.

#### 3.4.6 Observación de Biofilm

Como parte final, se procederá a realizar cortes sagitales de las raíces con el disco de diamante, se tomará muestras mediante escaneo el modo de fluorescencia de SM (Carl Zeiss), el láser de excitación de  $\leq 480$  nm y fluorescencia de  $\leq 500$  nm para determinar el espesor de

biofilm formado. Seguidamente, las imágenes obtenidas se muestran a 400 aumentos utilizando un software Carl Zeiss CLSM y ZEN 2012 para su análisis correspondiente.

### **3.5 Análisis estadístico**

Con todos los datos obtenidos, se realizará un análisis estadístico descriptivo y comparativo mediante el análisis de varianza ANOVA, la información se procesará en el software SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

#### 4 Bibliografía

- Federación Dental Internacional . (2015). Caries dental. En *EL DESAFÍO DE LAS ENFERMEDADES BUCODENTALES* (págs. 14-21). Ginebra: Federación Dental Internacional (FDI) en 2015.
- Barrancos, J., & Barrancos, G. (1999). Principios biológicos. En *Operatoria Dental* (págs. 551-566.). Buenos Aires: : Médica Panamericana.
- Burns, R., & James, E. (1999). Morfología dental y preparación cavitaria. En *Vías de la pulpa* (págs. 150-154). España: Harcourt.
- Clegg, M., Vertucci, F., Walker, C., Belanger, M., & Britto, L. (2006). The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *PubMed*, 434-437.
- Costerton, J. (2001). Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *PubMed*, 50-52.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., D, K., & James, G. (1994). Biofilms, the Customized Microniche. *Journal of Bacteriology*, 2137-2142.
- Cullen, J., Wealleans, J., Kirkpatrick, T., & Yaccino, Y. (2015). The Effect of 8.25% Sodium Hypochlorite on Dental Pulp Dissolution and Dentin Flexural Strength and Modulus. *Journal of Endodontics*, 920–924.
- España, A., J, A., Berini, L., & Gay-Escoda, C. (2004). Aplicaciones del láser en Odontología. *Revista Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*, 497-511.
- Forte, L., & Rebagliati, J. (2013). Biopelícula. Una nueva forma de resistencia bacteriana y su evolución. Un problema en la industria alimenticia, energética y farmacológica. . *Revista SNS*, 1-11.
- Friedman, S. ( 2003). Bioquímica de los tejidos dentarios mineralizados. En *Operatoria dental. Estética y adhesión* (págs. 12-18.). Buenos Aires: Guía SA.
- Glickman, N. (2009). AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: Background and Perspectives. *Journal od Endodonctics* , 1619–1620.
- Gómez, M., & Campos, A. (1999). En *Histología y embriología bucodental*. (págs. 175-225). Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Jhohnson, W., & Craig, W. (2010). Limieza y modelado . En *Endodoncia Principios y Práctica* (págs. 258-264). Barcelona : Elsevier .
- Kreisler, M., Kohnen, W., Beck, M., Al Haj, H., Christoffers, A., Götz, H., . . . D'Hoedt, B. (2003). Efficacy of NaOCl/H2O2 irrigation and GaAlAs laser in decontamination of root canals in vitro. *PubMed*, 189-196.
- Lasala, A. (2012). *Endodoncia*. Panamericana.

- Leonardo, M., Rossi, M., Sil-va, L., & Ito, I. B. (2002). EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *Journal of Endodontics*, 815-818.
- Liébana, J. (2002). *Microbiología oral*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.
- Maggioni, M., T, A., & Scarpelli, F. (2009). Endodoncia asistida por láser. En *Láser en Endodoncia* (págs. 113-128). Podova: Amalco.
- Onçağ, O., Hoşgör, M., Hilmioğlu, S., Zekioğlu, O., Eronat, C., & Burhanoglu, D. (2003). Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *PubMed*, 423-432.
- Organizacion Mundial de la Salud. (2018). Obtenido de Salud bucodental: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
- Pearson, G., & Schuckert, K. (2003). The role of lasers in dentistry: present and future. *PubMed*, 70-74.
- Schirrmeister, J., Liebenow, A., Braun, G., Wittmer, A., Hellwig, E., & Al-Ahmad, E. (2007). Detection and Eradication of Microorganisms in Root-filled Teeth Associated With Periradicular Lesions: An In Vivo Study. *Journal of Endodontics* , 536-540.
- Schwartz, Summitt, & Robbins. (1999). *Fundamentos en Odontología Operatoria*. Bogotá: Actualidades Médico Odontológicas Latinoamericana.
- Siqueira, J., & Rôças, I. (2009). Community as the unit of pathogenicity:emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *PubMed*, 870-80.
- Siqueira, J., & Rôes, I. (2008). Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *Journal of Endodontics*, 1291–1301.
- Siquiera, J., & Rocas, I. (2010). Microbiología Endondónica . En *Endondoncia Principios y Práctica* (págs. 38-46). Barcelona: Elsevier.
- Sirvent, F., & García, E. (2010). Biofilm. Un nuevo concepto de infección en Endodoncia. *Revista Endodoncia*, 241-256.
- Sirvent, F., & García, E. (2010). Biofilm. Un nuevo concepto de infección en Endodoncia en Endodoncia. *Endondocia* , 241-256.
- Stuart, C., Schwartz, S., Beeson, T., & Owatz, C. (2006). Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 93–98.
- Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., & Sjögren, U. (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontic*, 86-89.

- Svensäter, G., & Bergenholtz, G. (2005). Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics* , 27-36.
- Torabinejad, M., & Walton, R. (2010). Microbiología endodóncica . En *Endodoncia : principios y práctica*. Barcelona: Elsevier .
- Tronstad, L., Barnett, F., & Cervone, F. (1990). Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *PubMed*, 73-77.
- Trowbridge, H., & Kim, S. (1999). Desarrollo de la pulpa, estructura y función. . En S. Cohen, & R. Burns, *Vías de la pulpa* (págs. 362-400). Madrid: Harcourt.
- Williamson, A., Cardon, J., & Drake, D. (2009). Antimicrobial Susceptibility of Monoculture Biofilms of a Clinical Isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 95-97.
- Yan, G., Xiaoqiong, J., Dongjia, L., Yanhuo, C., & Zhongchun, T. (2016). The Starvation Resistance and Biofilm Formation of *Enterococcus faecalis* in Coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Endodontics*, 1233-1238.
- Zambrano de la peña, S., Salcedo, D., Petkova, M., & Ventocilla, M. ( 2016). Biofilm en Endodoncia: una revisión. *Revista Odontología Sanmarquina de la Facultad de Odontología*, 45-49.