

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias de la Salud

Estudio comparativo *in vitro* sobre la efectividad de la pasta de hidróxido de calcio, del aceite ozonizado, la irrigación con clorhexidina al 2% y la irrigación convencional y ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio al 5.25% frente al *Enterococcus faecalis* en dentina de bovino

María Gabriela Benalcázar Villamar

**Johanna Monar, Dra. Especialista en Endodoncia,
Directora de Tesis**

**Gabriela Vasco, Magister,
Directora de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Odontóloga

Quito, mayo del 2015

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Estudio comparativo *in vitro* sobre la efectividad de la pasta de hidróxido de calcio, del aceite ozonizado, la irrigación con clorhexidina al 2% y la irrigación convencional y ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio al 5.25% frente al *Enterococcus faecalis* en dentina de bovino

María Gabriela Benalcázar Villamar

Johanna Monar, Dra.,
Directora de Tesis/
Directora de Investigación

Gabriela Vasco, MSc.,
Directora de Tesis

Nicolás Castrillón, Dr.,
Miembro del Comité de Tesis

Ana Cristina Viteri, Dra.,
Miembro del Comité de Tesis

Iván Bedoya, Dr.,
Miembro del Comité de Tesis

Fernando Sandoval, Dr.,
Decano de la Facultad de Odontología

Quito, mayo del 2015

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma:

Nombre: María Gabriela Benalcázar Villamar

C. I.: 171355358-2

Fecha: Quito, mayo de 2015

DEDICATORIA

A mi mamá por su apoyo incondicional y aliento para cumplir mis metas.

A mi familia por ayudarme en todo momento y siempre creer en mí.

A Martina, mi alegría.

A mis amigas por los invaluable momentos de risa y motivación y por siempre estar ahí pase lo que pase.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi madre por todo su apoyo a lo largo de mi vida, por siempre motivarme a soñar y ayudarme a hacer realidad esos sueños. Has sido la mano que me ha guiado por este viaje y que me ha sostenido en todo momento en el que lo he necesitado.

Quiero agradecer a mi familia por ser uno de los pilares de mi vida, porque sin su ayuda no podría haber cumplido esta meta.

Agradezco a mis amigas por siempre estar presentes en mis mejores y peores momentos.

Gracias por enseñarme el significado de la verdadera amistad.

Agradezco a los profesores que desinteresadamente han contribuido a mi formación no solo académica sino también moral. Gracias por darnos su tiempo y esfuerzo cada día.

Agradezco, especialmente, a la Dra. Johanna Monar por todo su apoyo a lo largo de mi carrera y, particularmente, en la realización de este trabajo. Gracias por alentarme a cada paso y ayudarme a dar lo mejor de mí.

Agradezco a la Dra. Gabriela Vasco porque sin su apoyo no podría haber realizado el presente trabajo.

Gracias a todas las personas que contribuyeron a la elaboración de este estudio, su aporte ha sido invaluable.

Resumen

El objetivo de este estudio *in vitro* fue comparar la efectividad de la pasta de hidróxido de calcio, del aceite ozonizado, de la clorhexidina al 2%, de la irrigación convencional y de la irrigación ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio al 5.25% frente al *E. faecalis* en presencia de dentina.

Materiales y métodos: Cincuenta incisivos de bovino fueron cortados transversalmente para obtener raíces de 15mm de longitud que fueron preparadas con técnica convencional. Se dividió a los ejemplares en cinco grupos (n=10). Cada grupo constó de 8 muestras, un control positivo y un control negativo. Los grupos se infectaron con *E. faecalis* por 21 días, con excepción de los controles negativos. Una vez cumplido el plazo, cada una de las muestras se trató con una de las técnicas experimentales: irrigación convencional con hipoclorito de sodio al 5.25% por 10 minutos, irrigación ultrasónica pasiva (IUP) con hipoclorito de sodio al 5.25% por 30 segundos, irrigación con clorhexidina al 2% por 10 minutos, colocación de aceite ozonizado por 8 días y colocación de hidróxido de calcio por 15 días. Los controles positivos no recibieron ningún tratamiento. Se obtuvieron las muestras microbiológicas y se analizaron empleando el método del número más probable (NMP). El análisis estadístico se realizó utilizando el software IBM SPSS. Para comparar los datos obtenidos y obtener la significancia, se ejecutó la prueba de Mann-Whitney.

Resultados: El porcentaje de reducción bacteriana fue de 99,99% para la irrigación convencional, 99,99% para la IUP, 99,99% para la irrigación con clorhexidina, 99,78% para el aceite ozonizado y 74, 57% para el hidróxido de calcio. La prueba de Mann-Whitney determinó que no hay diferencia estadística entre la irrigación convencional, la IUP y la irrigación con clorhexidina. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el aceite ozonizado y los demás grupos. Igualmente, el hidróxido de calcio fue estadísticamente menos efectivo que los otros grupos. El nivel de significancia fue de $p < 0,05$.

Conclusiones: Ninguna de las técnicas estudiadas fue capaz de eliminar todas las bacterias presentes en el sistema de conductos. Las técnicas más eficaces fueron la irrigación convencional, la IUP y la irrigación con clorhexidina. Igualmente, el aceite ozonizado presentó un porcentaje de reducción bacteriana muy elevado. Sin embargo, el hidróxido de calcio tuvo el porcentaje de reducción bacteriana más bajo. Se aceptó parcialmente la hipótesis del estudio puesto que el grupo de clorhexidina fue uno de los más efectivos, pero el aceite ozonizado poseyó un resultado estadísticamente menor.

PALABRAS CLAVES: *Enterococcus faecalis*, hipoclorito de sodio, irrigación ultrasónica pasiva, clorhexidina, aceite ozonizado, hidróxido de calcio

Abstract

The goal of this *in vitro* study was to compare the efficacy of calcium hydroxide paste, ozonized oil, 2% chlorhexidine, conventional irrigation, and passive ultrasonic irrigation with 5.25% sodium hypochlorite against *E. faecalis* in the presence of dentine.

Materials and methods: fifty bovine incisors were transversely cut in order to obtain 15mm roots that were prepared with standard method. The roots were divided in five groups (n=10). Every group was composed of 8 specimens, one positive control, and one negative control. These groups were infected with *E. faecalis* for 21 days, except for the negative control. Once the incubation period was completed, all the roots were treated with one of the experimental techniques: conventional irrigation with 5.25% sodium hypochlorite for 10 minutes, passive ultrasonic irrigation (PUI) with 5.25% sodium hypochlorite for 30 seconds, irrigation with 2% chlorhexidine for 10 minutes, ozonized oil for 8 days, and calcium hydroxide for 15 days. Positive controls did not receive any treatment. Microbiological examples were analyzed with the most probable number (MPN) method. Statistical analysis was performed using IBM SPSS software. Mann-Whitney test was performed to compare the data obtained.

Results: The percentage of bacterial reduction was 99.99% for conventional irrigation, 99.99% for PUI, 99.99% for chlorhexidine irrigation, 99.78% for ozonized oil, and 74.57% for calcium hydroxide. The Mann-Whitney test determined that there is no significant difference between the conventional irrigation, PUI, and chlorhexidine irrigation. There were significant differences between ozonized oil and the other of the groups. Likewise, calcium hydroxide was significantly less effective than the other groups against *E. faecalis*. The overall level of statistical significance was $p < 0.05$.

Conclusions: None of the techniques studied was able to completely eliminate bacteria from the root canals. The most efficient techniques were conventional irrigation, PUI, and chlorhexidine irrigation. Likewise, the ozonized oil presented a high percentage of bacterial reduction. Calcium hydroxide had the lowest percentage of bacterial reduction. The hypothesis of the study is partially accepted since the chlorhexidine group was one of the most effective treatments, but the ozonized oil had a significant lower efficacy.

KEY WORDS: *Enterococcus faecalis*, sodium hypochlorite, passive ultrasonic irrigation, chlorhexidine, ozonized oil, calcium hydroxide

Tabla de contenido

Resumen.....	7
Abstract.....	8
1. Introducción	17
Texto introductorio	17
Justificación	18
Objetivo principal	19
Objetivos específicos	19
Hipótesis	19
2. Marco teórico.....	20
Fisiología de la pulpa normal.....	20
Vías de Infección pulpar	20
Respuesta inmunológica pulpar	21
Infección de túbulos dentinarios	22
Infección dentinaria inicial	24
Pulpitis	26
Necrosis	27
Periodontitis apical	28
Periodontitis apical aguda.....	28
Formación de fístula	29
Periodontitis apical crónica.....	29

	10
Tratamiento: preparación mecánica.....	30
Tratamiento: preparación química.....	32
Irrigación y aspiración.....	32
Hipoclorito de sodio.....	33
EDTA.....	39
Obturación.....	43
Restauración.....	43
Fracaso del tratamiento convencional.....	43
<i>Enterococcus faecalis</i>	45
Irrigación ultrasónica pasiva.....	58
Clorhexidina.....	65
Medicamentos intraconducto.....	70
Hidróxido de calcio.....	72
Aceite ozonizado.....	76
Cámara de bioseguridad tipo A2.....	80
3. Metodología.....	82
Muestra.....	82
Materiales.....	82
Muestras.....	82
Reactivos.....	82
Medios de almacenamiento y cultivo.....	83
Instrumental.....	83

	11
Materiales.....	84
Implementos de laboratorio	84
Equipos	85
Metodología.....	85
Recolección de las muestras	85
Preparación inicial y mecánica- química de las muestras.....	86
Grupos experimentales	88
Preparación de los medios de cultivo	89
Esterilización de las muestras	90
Preparación de inóculos de <i>E. faecalis</i>	90
Infección de las muestras	91
Preparación de los medicamentos y soluciones neutralizantes.....	92
Colocación del medicamento/irrigante	92
Preparación de medios de cultivo	95
Toma y análisis de muestras	96
Bilis esculina.....	98
Tinción gram.....	99
Catalasa.....	100
Análisis estadístico	101
4. Resultados	101
5. Discusiones	106
6. Conclusiones	123

7. Recomendaciones	124
8. Referencias.....	126
9. Anexos	133
Anexo 1. Índice de NMP y límites de confianza del 95% para una prueba de tres tubos.....	133
Anexo 2. Ecuación del NMP	134

Lista de figuras

Figura 1. Tomografía microcomputarizada de un primer molar previo (izq) y tras (der) la instrumentación. Áreas verdes sin instrumentar.	44
Figura 2. Adhesión de <i>E. faecalis</i> a dentina humana vieja y joven, con y sin barrillo dentinario (microscopio de escaneo electrónico 3000X).	50
Figura 3. Penetración tubular de <i>E. faecalis</i> (microscopio de escaneo electrónico 20000X)..	52
Figura 4. Formación de biofilm de <i>E. faecalis</i> a las 24 horas en sus distintas fases (microscopio de escaneo electrónico 2000X)	54
Figura 5. Cámara de bioseguridad tipo A2	81
Figura 6. Limpieza de las muestras	86
Figura 7. Muestra cortada.....	86
Figura 8. Extracción de la pulpa.....	87
Figura 9. Foramen sellado con resina.....	88
Figura 10. Colocación de esmalte de uñas	88
Figura 11. Esterilización de muestras	90
Figura 12. Agar con <i>E. faecalis</i>	91
Figura 13. Muestras infectadas.....	91
Figura 14. Muestras sumergidas en NaOCl	93
Figura 15. Muestras bajo luz UV	93
Figura 16. Muestras en frasco GasPak	94
Figura 17. Lima #40 adaptada al ultrasonido	95
Figura 18. Toma de muestra.....	97
Figura 19. Reacción positiva en caldo de enterococo	98
Figura 20. Reacción positiva en bilis esculina	99
Figura 21. Imagen microscópica (100X) de cocos gram positivos	100

Figura 22. Reacción positiva de catalasa	100
Figura 23. Esquema de la metodología	101
Figura 24. Microfotografía con microscopio de escaneo electrónico (5000X) de dentina radicular de humano (izq) y bovino (der).....	107

Lista de tablas

Tabla 1. Grupos experimentales.....	89
Tabla 2. Número más probable de bacterias	102
Tabla 3. Porcentaje de reducción bacteriana	102
Tabla 4. Resultados de grupos experimentales	103
Tabla 5. Resultados de la prueba de normalidad de los grupos experimentales	103
Tabla 6. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas de los grupos experimentales	104
Tabla 7. Prueba Kruskal-Wallis para los grupos experimentales	104
Tabla 8. Prueba de Mann-Whitney para los grupos experimentales.....	104
Tabla 9. Representación de las semejanzas y diferencias entre los grupos experimentales ..	105

Lista de gráficos

Gráfico 1. Medianas de los grupos experimentales	106
--	-----

Estudio comparativo *in vitro* sobre la efectividad de la pasta de hidróxido de calcio, del aceite ozonizado, la irrigación con clorhexidina al 2% y la irrigación convencional y ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio al 5.25% frente al *Enterococcus faecalis* en dentina de bovino

1. Introducción

Texto introductorio

En la odontología actual, la prevención es la base de todos los procedimientos. Es así que la endodoncia surge como un método preventivo secundario para evitar la extracción de las piezas dentarias con pulpa comprometida. Por lo tanto, los objetivos principales del tratamiento endodóncico son eliminar el tejido pulpar y alcanzar la mayor desinfección posible del sistema de conductos, asegurando así un resultado favorable. Esto se consigue mediante la preparación mecánica y química (Gangwar, 2011; Aravind, Gopikrishna, Kandaswamy & Jeyavel, 2006, citados en Joy, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011; Lee, Han, Hong, Lee, Ji & Kum, 2008, citados en Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012).

No obstante, en los casos de necrosis pulpar existe una amplia contaminación microbiana. En consecuencia, se han obtenido cultivos positivos entre el 40 y 60% de los casos tras la instrumentación e irrigación convencional (McGurkin-Smith, Trope, Caplan, Sigurdsson, 2005, citados en Siqueira, Magalhães, & Rôças, 2007). Por lo que, para alcanzar los objetivos del tratamiento, se recomienda el uso de medicamentos intraconducto (Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012; Gangwar, 2011; Joy, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011; Machado, Alves, Uzeda, Rocas, & Siqueira, 2010; Pavaskar, y otros, 2012; Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013; Siqueira, Magalhães, & Rôças, 2007; Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007) o de irrigación ultrasónica pasiva (Al-

Ali, Sathorn, & Parashos, 2012; Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Harrison, Chivatxaranukul, Parashos, & Messer, 2010).

Hermann (1920) fue primero en proponer el uso de hidróxido de calcio en la práctica clínica como medicamento intraconducto (citado en Gangwar, 2011). Sin embargo, numerosos estudios recientes han probado su ineffectividad antimicrobiana frente a especies resistentes como el *Enterococcus faecalis*, uno de los principales responsables del fracaso del tratamiento endodóncico (Molander, et al., 1998, citado en Lucena, y otros, 2013; Pirani, Bertacci, Cavrini, et al., 2008, citados en Pavaskar, y otros, 2012; Siqueira & Rocas, 2004, citados en Joy, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011; Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo, 1997, citados en Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012).

En consecuencia, se han sugerido varias sustancias para combatir a las cepas más resistentes de microorganismos asociados a la patología pulpar y periapical. Si bien la clorhexidina al 2% ha probado ser efectiva (Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012; Jayasimha & Mylswamy, 2011; Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007; Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011), estudios recientes presentan al aceite ozonizado (Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007) o a la irrigación ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio (Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Cki, Kim, Ling, Choi, Pashley, Tay, 2009, citados en Glassman, 2011; Harrison, Chivatxaranukul, Parashos, & Messer, 2010) como los posibles candidatos a la mejor técnica de desinfección del sistema de conductos. Sin embargo, no han sido probados en dentina bajo condiciones iguales para determinar y comparar su eficacia antimicrobiana.

Justificación

Existe la necesidad de encontrar una técnica de desinfección intraconducto que elimine la mayor cantidad de microorganismos debido a que entre el 40 y 60% de los conductos presenta

cultivos positivos tras la preparación mecánica y química convencional (McGurkin-Smith, Trope, Caplan, Sigurdsson, 2005, citados en Siqueira, Magalhães, & Rôças, 2007).

Además, no se ha realizado un estudio donde se compare la capacidad antimicrobiana de la pasta de hidróxido de calcio, el aceite ozonizado, la clorhexidina al 2% y la irrigación ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio al 5.25% frente al *E. faecalis* en dentina bajo condiciones iguales para poder determinar cuál de estas técnicas es la más efectiva y, por ende, debería recibir más atención en futuras investigaciones que conlleven un mayor éxito en el tratamiento endodóncico.

Objetivo principal

Evaluar y comparar experimental y microbiológicamente *in vitro* la efectividad de la pasta de hidróxido de calcio, del aceite ozonizado, de la clorhexidina al 2%, de la irrigación convencional y de la irrigación ultrasónica pasiva con hipoclorito de sodio al 5.25% frente al *E. faecalis* en presencia de dentina.

Objetivos específicos

- Determinar la sustancia o sustancias más efectivas para combatir al *E. faecalis* en el sistema de conductos.
- Determinar beneficios y limitaciones de cada sustancia.

Hipótesis

El aceite ozonizado y la clorhexidina al 2% serán las sustancias con mayor capacidad antimicrobiana frente a *E. faecalis* en presencia de dentina.

2. Marco teórico

Fisiología de la pulpa normal

La pulpa y la dentina poseen un origen embrionario mesenquimatoso común y forman un complejo funcional, el complejo dentino-pulpar, cuyas principales funciones son la producción de dentina y sensibilidad dental (Fouad, 2009).

La pulpa es un tejido conectivo que presenta células especializadas, los odontoblastos, productores de dentina; además, se encuentran nervios, tejido vascular, fibras de tejido conectivo, sustancia fundamental, fluido intersticial, células inmunológicas (linfocitos T y B, macrófagos y células dendríticas), entre otras (Cohen & Burns, 2002; Torabinejad & Walton, 2010).

La dentina es una estructura porosa debido a las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos durante la formación de este tejido. Tales prolongaciones llevan a la formación de los túbulos dentinarios (Fouad, 2009). Así, la dentina madura se encuentra compuesta por un 70% de material inorgánico (hidroxiapatita), 20% de material orgánico (91% de colágeno tipo I) y 10% de agua (Cohen & Burns, 2002).

Vías de Infección pulpar

Las bacterias son el principal factor etiológico de caries, infección pulpar y periapical. No obstante, tanto la pulpa como la dentina saludables son estériles (Torabinejad & Walton, 2010). Por lo tanto, existen tres rutas de acceso al tejido pulpar: la primera es mediante contaminación dentinaria, la segunda mediante exposición pulpar directa por trauma o fractura y la tercera por el foramen apical por trauma o bolsa periodontal (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010).

Respuesta inmunológica pulpar

Entre los sistemas de defensa del complejo pulpo-dentinario se encuentran: la capacidad amortiguadora (buffering) de la matriz dentinaria y del fluido tubular, un flujo de fluido dentinario hacia el exterior de la pulpa, la esclerosis tubular, la formación de dentina reparativa y la reacción inflamatoria de la pulpa (Fouad, 2009).

Por su parte, tanto la salida de fluido dentinario, como esclerosis tubular y la formación de dentina reparativa alteran la permeabilidad tubular y retrasan la infección (Cohen & Burns, 2002; Torabinejad & Walton, 2010). De esta manera, el fluido dentinario oblitera los túbulos. Semejante, en la esclerosis dentinaria se deposita minerales de hidroxiapatita, trifosfato de calcio y magnesio en el interior de los túbulos. Por su parte, la dentina reparativa, que se forma en respuesta a una agresión crónica alrededor de la pulpa, es más atubular e irregular y menos permeable en la interfase entre dentina primaria y reparativa (Cohen & Burns, 2002).

En general, el momento en el que hay invasión dentinaria, se espera que haya respuesta pulpar debido al flujo de productos bacterianos tóxicos. Ya que es una infección crónica lenta, el infiltrado inflamatorio inicial consiste en linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Sin embargo, si la infección persiste, se superan los sistemas de defensa y llega a pulpa habrá migración de leucocitos polimorfonucleares. Así, se produce necrosis pulpar debido a la liberación de lisozimas que digieren el tejido adyacente (Cohen & Burns, 2002; Torabinejad & Walton, 2010).

El limitado flujo sanguíneo de la pulpa también influencia en esta pérdida de vitalidad (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010). Esto se debe, principalmente, a la incapacidad de drenar el infiltrado inflamatorio que lleva a un aumento marcado de la presión y estrangulamiento apical (Torabinejad & Walton, 2010). Por ello, los dientes jóvenes con foramen abierto pueden soportar mejor las agresiones que dientes viejos con foramen cerrado

(Fouad, 2009). Así, la necrosis es el final de la inflamación pulpar. Bajo estas circunstancias, la infección bacteriana se propaga fácilmente (Fouad, 2009).

Infección de túbulos dentinarios

Una vez que se han traspasado las barreras de esmalte o de cemento, los túbulos dentinarios se convierten en caminos de propagación de bacterias y de sustancias. Si la respuesta pulpar es superada por la infección, se producirá pulpitis, seguida de necrosis pulpar, infección del sistema de conductos y, finalmente, enfermedad periapical (Bergenholtz, Horsted-Bindslev, & Reit, 2007; Cohen & Burns, 2002; Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010).

De esta manera, las infecciones dentinarias son resultado de la exposición de dentina a placa supra o infragingival. Esto se da en caso de lesiones cariosas, procedimientos restauradores o periodontales, desgaste dental, grietas en esmalte o dentina o trauma dental (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010).

Para iniciar la colonización del huésped, las bacterias deben adherirse a los tejidos del mismo. Una vez que se establece la adhesión, deben utilizar los nutrientes del medio, competir o cooperar con otras especies y frenar las defensas del huésped. De esta manera, consiguen crecer y multiplicarse (Bergenholtz, Horsted-Bindslev, & Reit, 2007; Fouad, 2009).

Con respecto al mecanismo de adhesión, las bacterias suelen emplear adhesinas superficiales o fimbrias que se unen a receptores del huésped o al esmalte o a la dentina. Normalmente, se unen a una sustancia protéica presente en la dentina. Tal es el caso de la saliva, proteínas del tejido y glicoproteínas. También, el colágeno tipo I no mineralizado, presente en los tejidos duros del diente, suele ser el medio de unión para estreptococos orales. Éstos expresan un antígeno conocido como adhesina polipeptídica I/II para lograr dicha adhesión. El aumento en la expresión de este antígeno por parte de los estreptococos produce

una respuesta de crecimiento morfológico que se manifiesta en el alargamiento de sus cadenas (Fouad, 2009).

La disposición de nutrientes puede influenciar el grado de penetración de la infección. A su vez, la cantidad de alimento está relacionada al diámetro y permeabilidad de los túbulos ya que depende del grado de difusión. Así, se puede encontrar mayor cantidad de bacterias cariogénicas en la superficie de los conductos, cerca de carbohidratos y oxígeno. Con respecto al ambiente anaeróbico en el interior de los conductos, la presencia de componentes tisulares suele favorecer al crecimiento de bacterias resistentes como *Petrovella intermedia* y *Peptostreptococo micros* (Fouad, 2009).

Las bacterias pueden competir o cooperar en la invasión dentinaria (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010). Esto depende de modificaciones del ambiente dentinario realizadas por las mismas bacterias. Entre estas, se encuentran la tensión de oxígeno y la producción de bacteriocinas que facilitan la invasión de ciertas especies e inhiben la de otras. Entre estas bacteriocinas se encuentra el antígeno polipéptido I/II que, dependiendo de la especie, facilitará la unión de tal o cual bacteria colonizadora secundaria. Por ejemplo, el *Streptococo gordonii* facilita la colonización de *Porfiromonas gingivalis*. Por otro lado, la invasión primaria de *Streptococo mutans* inhibe la invasión de *P. gingivalis* (Fouad, 2009).

Por su parte, la capacidad de formar biofilms protege a las bacterias de varias formas. Entre ellas se encuentra protección contra las defensas del huésped, contra la deshidratación, contra agentes terapéuticos (resistencia genética, crecimiento lento, poca penetración, inactivación y neutralización), nueva expresión genética, persistencia de un sistema de fluidos, heterogenicidad espacial y ambiental, interacción metabólica, sistema de nutrientes y elevadas concentraciones de nutrientes (Fouad, 2009). Estos biofilms suelen aparecer en el conducto principal, istmos, conductos laterales y túbulos dentinarios (penetrando hasta 300µm), complicando aún más su remoción (Torabinejad & Walton, 2010).

Otro factor importante a considerar es la estructura en sí de la dentina y su relación con esmalte y cemento. Así, la cantidad de túbulos por milímetro cuadrado a nivel de la unión esmalte-dentina es de 15.000, mientras que a nivel de la pulpa es de 45.000. Igualmente, el diámetro de los canales varía de 0.9 μm en la unión esmalte-dentina (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010) a 2.5 μm a nivel de la pulpa. En base a esto se puede determinar que los estreptococos, al ser más pequeños que los túbulos (0.5-0.7 μm), pueden penetrar en los mismos (Fouad, 2009).

De forma semejante, el grado de permeabilidad también depende del área del diente, el contenido de los túbulos y la edad de la persona. Así, la dentina perirradicular se mineraliza más con la edad, disminuyendo el diámetro de los túbulos y hasta obliterándolos. Esto ocurre, especialmente, entre las edades de 20 y 80 años y sigue una dirección ápico-coronal. Así, se crea una barrera física a la invasión bacteriana. En consecuencia, el patrón de infección bacteriana va a variar según el área del diente, siendo mayor a nivel cervical y medio de la raíz y menor a nivel apical, por menor presencia de túbulos permeables (Fouad, 2009).

Finalmente, la disminución de flujo tubular, como mecanismo de defensa, facilita la difusión de productos bacterianos tóxicos hacia la pulpa o tejidos perirradiculares. De esta forma, aumenta su patogénesis (Fouad, 2009).

Infección dentinaria inicial

El tipo de flora presente en el sistema de conductos depende del tipo de bacteria en la infección primaria de la dentina cariada o no cariada. Cuando el origen de la infección es placa supragingival, las subespecies encontradas en la superficie dentaria son *Streptococos*, *Lactobacilos* y *Actinomices* spp. (Fouad, 2009; Hahn & Liewehr, 2007; Torabinejad & Walton, 2010). Así, el *Streptococo mutans* y el *Streptococo sobrinus* suelen ser los principales iniciadores de caries coronal o radicular (Hahn & Liewehr, 2007; Fouad, 2009).

En consecuencia, la infección superficial suele ser mayor que la profunda y estar constituida principalmente de las subespecies antes mencionadas, *Eubacterium alactolyticum*, *Fusobacterium nucleatum* y otros bacilos gram-positivos (Fouad, 2009). Por otro lado, en la dentina profunda se encuentra infectada en su mayoría por bacilos anaerobios gram-positivos (Bergenholtz, Horsted-Bindslev, & Reit, 2007; Fouad, 2009) como *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* spp. Igualmente, *Actinomices* y *Lactobacilos* spp. son las bacterias facultativas más prevalentes. También, existe la presencia de estreptococos, aunque representan solo una minoría (Fouad, 2009).

De esto se puede concluir que el ambiente superficial favorece la prevalencia de anaerobios facultativos; mientras que el ambiente profundo favorece el crecimiento de anaerobios estrictos (Fouad, 2009). No obstante, la presencia inicial de anaerobios facultativos es necesaria para que los anaerobios sobrevivan la fase inicial de infección ya que los facultativos reducen el potencial redox consumiendo el oxígeno (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010).

La penetración bacteriana a través de dentina no cariada se da en una semana de exposición al medio oral. Los microorganismos invasores son, principalmente, estreptococos y *Actinomyces* spp., es decir, microorganismos gram-positivos. También, se puede encontrar *P. micra* y organismos gram-negativos en menor número. Este biofilm para ser semejante al que infecta la interfase diente-restauración (Fouad, 2009).

El *Actinomices naeslundii* es la especie que más se asocia a invasión dentinaria a través de caries de cemento. En general, las *Actinomices* spp. se encuentran en dentina superficial, media y profunda con mayor número en la profunda. Semejante es el caso de los *Streptococo mutans* que aparecen a todos los niveles de dentina aunque con mayor cantidad en la superficie y menor en la profundidad. Por otro lado, los *Lactobacilos* spp. y los gram-negativos se encuentran en niveles bajos o no están presentes (Fouad, 2009).

Con respecto a la infección por bolsa periodontal, esta consiste de bacterias gram positivas, principalmente. Entre ellas *P. micra*, *S. intermedius* y *A. naeslundii*. También, en menor cantidad, se encuentran gram-negativos como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Tannerella forsythia*, *F. nucleatum* y *Veillonella párvula*. Aunque no está completamente claro, parece que las bacterias penetran el cemento a través de zonas con alteraciones estructurales y no por cemento sano. No obstante, la infección desde una bolsa periodontal hacia la pulpa se asocia con la presencia de canales laterales o en casos de enfermedad periodontal avanzada que involucra al ápice (Fouad, 2009).

Pulpitis

Mientras la pulpa se encuentre vital, las defensas del huésped impedirán la propagación de la infección. Así, la flora bacteriana encontrada en dentina cariada en dientes con pulpitis suele ser la misma que en dentina cariada en dientes sin inflamación pulpar. En general, hay predominio de bacterias gram-positivas, especialmente *Lactobacilos* spp. y estreptococos. Las bacterias gram-negativas están presentes en número reducido en la superficie aunque se vuelven más abundantes cerca de la pulpa. De ahí que se ha encontrado correlación entre la presencia de *P. intermedia* y *P. melaninogénica* e inflamación pulpar extensa (Fouad, 2009).

La inflamación pulpar se puede mantener por un tiempo prolongado y la necrosis puede ser gradual o acelerada. Esto depende de la virulencia bacteriana, la capacidad para evacuar líquidos inflamatorios, la resistencia del huésped, la cantidad de circulación y el drenaje linfático. Así, la necrosis suele extenderse en forma gradual de coronal a apical y suele necrosarse la parte más externa antes de profundizarse (Torabinejad & Walton, 2010).

Necrosis

Una vez que se produce la necrosis pulpar, existe un proceso de selección de las bacterias invasoras. Esto se da mediante la ruta de infección y el ambiente interior de los conductos (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010). A su vez, depende si el sistema de conductos está abierto al ambiente oral. Así, se puede esperar una microflora más variada en dientes con comunicación a boca (Fouad, 2009).

La intensidad de la infección se relaciona a la actividad bacteriana y ciertos factores de crecimiento que favorecen a unas y perjudican a otras especies. De esta manera, el crecimiento bacteriano depende de un metabolismo anaeróbico, proteolítico y alcalino, favorecido por la naturaleza proteica de la pulpa. De ahí que exista una menor cantidad de bacterias sacarolíticas (facultativas) por la baja presencia de carbohidratos y oxígeno al interior de los conductos (Bergenholtz, Horsted-Bindslev, & Reit, 2007; Fouad, 2009). En general, se compone de una flora mixta con 10^3 - 10^8 bacterias por conducto (Torabinejad & Walton, 2010).

La microflora bacteriana presente en el sistema de conductos en dientes sin exposición al medio oral se compone, en especial, de anaerobios obligados: *Fusobacterium*, *Peptostreptococos*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Wolinella*, *Petrovella* y *Porfiromonas*, principalmente. También, existe la presencia de estreptococos, lactobacilos y *Actinomyces* spp. Igualmente, se encuentran espiroquetas como treponema y otros microorganismos como *Cándida* y *Saccharomyces* spp. Así, la infección primaria consiste de entre 10 y 12 especies, predominantemente anaerobias (Fouad, 2009). Cabe aclarar que entre el 40 y 55% de esta microbiota está conformada por bacterias no cultivables (Torabinejad & Walton, 2010).

Una vez que las bacterias penetran en el sistema de conductos, éstas invaden la dentina radicular. Este tipo de infección es semejante al de la lesión cariosa dentinaria profunda con

especies de *Lactobacilos*, estreptococos y *Propionibacterium* como predominantes. También, hay la presencia de cocos anaerobios gram-positivos como *Eubacterium* y *Veillonella* spp., en números menores. Anaerobios obligados gram-negativos como *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*, están presentes en cantidades variables. Finalmente, levaduras y bacterias no cultivables como *Porfiromonas endodontalis*, han sido identificadas (Fouad, 2009).

Periodontitis apical

Una vez destruido el sistema de defensa del diente (la pulpa), la infección del conducto se propaga por los tejidos vitales en la región apical y una inflamación se desarrolla en los tejidos periapicales que puede ser aguda o crónica (Fouad, 2009).

Periodontitis apical aguda

Se caracteriza por un aumento en el metabolismo y multiplicación bacteriana de una infección anaeróbica polimicrobiana. Así, la respuesta del huésped es inespecífica: granulocitos polimorfonucleares. En consecuencia, debido a la acción fagocítica de estas células, existe reabsorción de tejidos y formación de una cápsula fibrosa para encapsular la infección. De esta manera, se forma un absceso con contenido purulento (Fouad, 2009).

Además de la fase de crecimiento activo, factores del huésped influyen en la invasión periapical. Entre ellos, la presencia de ciertos componentes sanguíneos y suero. También, el tamaño del foramen apical interviene en cuánto se puede propagar la infección. Por lo que un foramen amplio en un individuo joven, facilitará el ingreso bacteriano (Fouad, 2009).

No obstante, cabe aclarar que si bien la infección anaerobia es inespecífica, no todas las bacterias pueden colonizar el sistema de conductos ya que necesitan de ciertos factores de virulencia. Entre ellos la cápsula, leucotoxinas, resistencia al complemento y enzimas degradadoras de inmunoglobulinas. En general, las bacterias implicadas en esta infección son

predominantemente estreptococos, *Peptoestreptococos* (*Parvimonas micra*), *Petrovella* y *Fusobacterium*. También, se pueden encontrar cocos y bacilos anaerobios o microaerófilos gram-positivos (Fouad, 2009)

Formación de fístula

Cuando las defensas del cuerpo no son capaces de contener la infección en el absceso, la infección se expande siguiendo ciertas rutas. Generalmente, el absceso crece hacia la zona de menor resistencia y forma un drenaje que suele aparecer en la cavidad oral. Así, se forma el tracto sinusal cuya microflora es, a su vez, anaerobia mixta. De esta manera, se termina la fase aguda con disminución de los síntomas y comienza la fase crónica (Fouad, 2009).

Por otro lado, la infección puede propagarse de forma difusa a los tejidos y ocasionar inflamación de los nódulos linfáticos. En tales casos, el uso de antibióticos sistémicos es recomendado. De forma semejante, el contenido purulento puede invadir ciertas regiones de cuello y cabeza que derivan en complicaciones serias (Fouad, 2009).

Periodontitis apical crónica

Se puede considerar a la infección crónica como una etapa en la cual las bacterias presentan un estado metabólico bajo con poca o nula multiplicación. Como respuesta, el sistema de defensa del huésped cambia a linfocitos y células plasmáticas productoras de anticuerpos. También, el tejido se convierte en tejido granulomatoso, el cual previene la propagación bacteriana. Por lo general, estas lesiones son asintomáticas y consisten en un hallazgo radiográfico (Fouad, 2009).

Tratamiento: preparación mecánica

Las bases del tratamiento endodóncico son la eliminación completa de tejido pulpar vital o necrótico, remoción de microorganismos y dentina afectada y desinfección del sistema de conductos. En general, el principio de preparación cónica con mínima transportación debe ser cumplido. Esto se debe a que se elimina la mayor parte de dentina infectada a nivel coronal y medio y se realiza una mínima preparación a nivel apical, donde existe menor presencia de infección. Igualmente, se facilita la obturación (Fouad, 2009).

Existen dos tratamientos endodóncicos radiculares: biopulpectomía y necropulpectomía. En el primer caso, la pulpa se encuentra vital y los microorganismos están en la superficie del tejido. Por lo tanto, siguiendo los principios de asepsia y antisepsia, será posible impedir su difusión al sistema de conductos. Es así que éste es un tratamiento sencillo con alto índice de éxito. Por otro lado, cuando la pulpa se encuentra necrótica y altamente infectada es necesario combatir dicha infección. En consecuencia, existe un menor porcentaje de éxito (Torabinejad & Walton, 2010).

De esta manera, existen etapas para la preparación radicular: acceso cameral, explotación del conducto radicular, odontometría, limpieza del conducto y conformación del mismo (Soares & Goldberg, 2007).

El acceso cameral consiste en crear una comunicación entre el sistema de conductos y el medio externo para poder acceder a los mismos. En general, dicho acceso debe permitir que los instrumentos ingresen en línea recta hasta el foramen o hasta la primera curvatura. También, se debe poder localizar todos los conductos, conservar al máximo la estructura dental sana y eliminar todo tejido cariado y restauraciones defectuosas. Para cumplir con dichos objetivos, hay que realizar una completa eliminación del techo cameral y respeto absoluto del piso de cámara. Al final, se debe conseguir una preparación lisa y en forma de embudo (Cohen & Burns, 2002).

La exploración del conducto consiste en introducir un instrumento fino en cada canal para determinar cuántos hay, el calibre de los mismos y la posibilidad de acceso al tercio apical. La longitud de trabajo aproximada con la que se realiza dicha exploración se determina mediante la radiografía diagnóstica. Una vez determinada la permeabilidad, se debe tomar la longitud de trabajo real. Para obtenerla se recomienda el empleo de localizador apical que usa corriente eléctrica para localizar la constricción apical. Finalmente, esta longitud se confirma con una radiografía (Soares & Goldberg, 2007).

Con respecto a la conformación del conducto, existen dos técnicas dependiendo de la dirección que sigue la instrumentación: ápico-coronaria y corono-apical. En la primera se reduce progresivamente la longitud de trabajo a medida que hay aumento en el calibre de los instrumentos; en la segunda se reduce el calibre del instrumento a medida que se acerca a la longitud de trabajo. De esta forma, se consigue conicidad del conducto (Soares & Goldberg, 2007).

Con respecto a sus indicaciones, una técnica ápico-coronaria se recomienda para conductos curvos y la corono-apical para necropulpectomía. Esto se debe a que la primera permite un ensanchamiento apical inicial, por lo que hay menor riesgo de formar escalones o de fracturar al instrumento. Por su parte, la segunda permite una limpieza progresiva antes de llegar a apical, evitando así la extrusión de material contaminado al periápice. No obstante, dichas indicaciones son flexibles y el empleo de tal o cual técnica, así como de su combinación, dependerán de cada caso en particular (Soares & Goldberg, 2007).

La técnica ápico-coronal tiene dos fases: la conformación del tercio apical y la conformación de los tercios medio y cervical. Con respecto a la primera fase, ésta consiste en introducir un instrumento de calibre pequeño a longitud de trabajo y limar el conducto hasta que el instrumento quede holgado. Dicha acción se repite hasta que se llega al cuarto instrumento a dicha longitud. Este cuarto instrumento se conoce como lima de memoria

(Soares & Goldberg, 2007). En general, se recomienda una lima de memoria de calibre 35 o 40 (Torabinejad & Walton, 2010). En la segunda, los instrumentos se calibran para que cada uno sea 1mm más corto que el anterior. La lima de memoria se emplea entre instrumento e instrumento para mantener la permeabilidad del conducto. Asimismo, se recomienda el uso de tres instrumentos por encima de la lima de memoria (Soares & Goldberg, 2007).

Con respecto a la técnica corono-apical, primero se conforman los tercios medio y cervical y, seguido, el tercio apical. Así, con una longitud de exploración 5mm más corta que la longitud radiográfica aparente, se explora el conducto y se elige el instrumento que quede ajustado a este nivel. A partir de este instrumento, se reduce el calibre hasta llegar a longitud aparente, momento en el que se realiza la odontometría. De esta forma, se limpia primero la porción coronal más infectada, antes de llegar a la apical (Soares & Goldberg, 2007).

Tratamiento: preparación química

Si bien la conformación mecánica es esencial, se requiere del empleo de sustancias químicas para remover los desechos orgánicos e inorgánicos de los conductos, además de eliminar microorganismos. En base a esto, se puede dividir a estos procedimientos en: irrigación y aspiración, uso de quelantes y medicación intraconducto entre sesiones (Soares & Goldberg, 2007).

Irrigación y aspiración

Este procedimiento consiste en introducir sustancias irrigantes en el sistema de conductos con una aguja muy fina, de forma continua, y aspirar los mismos con succión. Se realiza antes, durante y después de la instrumentación. Así, desde el primer contacto con el conducto, durante la conformación del acceso, se procede a irrigarlo. También, entre instrumento e

instrumento en la preparación mecánica y una vez culminada la misma (Cohen & Burns, 2002; Soares & Goldberg, 2007).

Esto es indispensable ya que la instrumentación sola es incapaz de limpiar adecuadamente los conductos, en gran parte debido a su intrincada anatomía (Fouad, 2009) (extensiones ovales, istmos y deltas apicales) (Wu & Wesselink, 2001, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Por ejemplo, dentro de conductos ovales, solo un 40% de la pared puede ser contactada durante la instrumentación, por lo que es imposible eliminar todas las bacterias del conducto (Wu et al., 2003, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). También, se encuentra en hecho de que las limas acumulan residuos. Bajo estas condiciones ya no son capaces de trabajar. Por lo tanto, la irrigación limpia tanto a los conductos como a los instrumentos (Cohen & Burns, 2002).

Existen ciertas características en un irrigante ideal: disolver tejidos orgánicos, disolver tejidos inorgánicos, acción antimicrobiana, biocompatibilidad, baja tensión superficial, acción lubricante (Cohen & Burns, 2002; Torabinejad & Walton, 2010), habilidad de penetrar profundo en los túbulos, no ser tóxico, ser fácil de usar y tener un costo moderado (Glassman, 2011). En general, sus objetivos más relevantes son: limpieza, desinfección y lubricación del sistema de conductos (Soares & Goldberg, 2007).

Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio (NaOCl) es el irrigante endodónico por excelencia (Cohen & Burns, 2002; Soares & Goldberg, 2007; Torabinejad & Walton, 2010). Esto se debe a que tiene propiedades de buena limpieza, desinfección efectiva, neutralización de toxinas, disolución de tejidos orgánicos y acción rápida, desodorizante y blanqueante (Soares & Goldberg, 2007; Torabinejad & Walton, 2010). Además, es barato, fácil de conseguir (Torabinejad & Walton, 2010) y presenta pocas complicaciones clínicas (Cohen & Burns, 2002).

A temperatura corporal, la clorina reactiva en solución acuosa toma dos formas: hipoclorito (OCl) y ácido hipocloroso (HOCl) con valores de pH arriba y bajo 7.6, respectivamente. Ambas formas son agentes oxidativos extremadamente reactivos (Mohammadi, 2008, citado en Rahimi, y otros, 2014). Soluciones de hipoclorito de sodio puras, como las usadas en endodoncia, son básicas ya que toda la clorina disponible está en forma de OCl (Zehnder, Kosicki, Luder, Sener & Waltimo, 2002, citados en Rahimi, y otros, 2014). Es así que el hipoclorito disuelve el tejido necrótico desdoblado a las proteínas en aminoácidos (Cohen & Burns, 2002; Torabinejad & Walton, 2010). En consecuencia, su efecto depende de la cantidad de hipoclorito libre, aunque se puede aumentar su volumen para compensar por una menor concentración (Torabinejad & Walton, 2010).

Sin embargo, necesita de contacto directo para tener efectividad (Retamozo, Shabahang, Johnson, Aprecio, & Torabinejad, 2010). Esto hace que tenga una capacidad limitada para disolver tejidos en el conducto ya que no puede contactar a los mismos en todas sus zonas. (Torabinejad & Walton, 2010). No obstante, concentraciones mayores de NaOCl diluyen mejor los tejidos (Retamozo, Shabahang, Johnson, Aprecio, & Torabinejad, 2010). También, se puede aumentar la temperatura de soluciones de baja concentración para optimizar su capacidad de disolver tejidos (Abou-Rass & Oglesby, 1981, citados en Rahimi, y otros, 2014; Cohen & Burns, 2002; Fouad, 2009). Así, incrementar su temperatura en 5° duplica esta capacidad (Cunningham & Balekjian, 1980, citados en Rahimi, y otros, 2014).

Por otro lado, tiene un pH aproximadamente entre 12 y 13, considerado tóxico. Por lo tanto, se suelen diluir las soluciones de hipoclorito de sodio en bicarbonato de sodio al 1%, aunque esto no aumenta la eficacia bacteriana de forma significativa. Diluido debe almacenarse en un lugar fresco y oscuro y no dura más de 1 a 2 semanas (Cohen & Burns, 2002; Siqueira, Batista, Fraga & de Uzeda, 1998, citados en Retamozo, Shabahang, Johnson,

Aprecio, & Torabinejad, 2010; Zehnder, Kosicki, Luder, Sener & Waltimo, 2002, citados en Rahimi, y otros, 2014).

Si bien la literatura es contradictoria, varios estudios apoyan que el potencial antimicrobiano del hipoclorito de sodio se maximiza con energía ultrasónica (Fouad, 2009). Esto puede deberse, en parte, a que sus propiedades físicas tienen efecto sobre la transmisión de energía ultrasónica (Leighton, 1994, citado en Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013). No obstante, parece que la profundidad de inserción de la aguja es la variable más importante durante la irrigación (Ram, 1977, citado en Bhuva, y otros, 2010). Aunque, se recomienda una inserción de 3-4mm del límite de la preparación (Cohen & Burns, 2002; Soares & Goldberg, 2007).

Las soluciones de hipoclorito de sodio se pueden emplear a varias concentraciones: a bajas concentraciones como el solución de Dankin (0.5%) y solución de Milton (1%), a concentraciones medias (2.5%) o a concentraciones altas como la soda clorada (4% a 6%) (Soares & Goldberg, 2007; Torabinejad & Walton, 2010). Existen varias discrepancias con respecto a cuál es la más recomendable.

Con respecto al líquido de Dankin (0.5%), ha sido recomendado para biopulpectomía (Soares & Goldberg, 2007). No obstante, debido a su menor concentración, se aconseja un mayor tiempo de exposición (Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). Entre sus ventajas están una menor toxicidad y que no se ha observado disminución del módulo de elasticidad y fuerza flexural en dentina humana (Sim, Knowles, Ng, Shelton & Gulabivala, 2001, citados en Rahimi, y otros, 2014).

Por el contrario, otros autores consideran que se deberían emplear concentraciones más altas que 0.5%. Esto se debe a que la efectividad antimicrobiana y capacidad de disolución de tejidos del NaOCl están en función a su concentración, aunque también su toxicidad (Khademi, Usefian & Feizianfard, 2007, citados en Rahimi, y otros, 2014). Por su parte,

estudios *in vitro* indican que la solución de Milton (1%) debería ser suficiente para disolver toda la pulpa durante la sesión, empleada en abundancia. Además, se considera una concentración adecuada para limpiar conos de gutapercha (Cohen & Burns, 2002; Siqueira, da Silva, Cerqueira, Lopes & de Uzeda, 1998, citados en Rahimi, y otros, 2014).

No obstante, otros autores han recomendado concentraciones medias para biopulpectomías (Soares & Goldberg, 2007) o para todo escenario clínico (Torabinejad & Walton, 2010). Sin embargo, se ha considerado que una concentración alta (5.25%) es muy tóxica, afecta a tejidos vivos y no aumenta el potencial antimicrobiano (Cohen & Burns, 2002). También, disminuye el módulo de elasticidad y fuerza flexural de dentina humana (Sim, Knowles, Ng, Shelton & Gulabivala, 2001, citados en Rahimi, y otros, 2014). Aun así, otros autores han sugerido emplearla con mayor tiempo de exposición que el usual en caso de infección persistente (Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010).

Por otro lado, se ha reportado un aumento de penetración tubular con más concentración pero no es relevante. Aunque, un incremento en tiempo de exposición significa más penetración en comparación a la concentración (Zou, Shen, Li, et al., 2010, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). Así, se puede decir que su efectividad es dependiente del tiempo de exposición; no obstante, esto es malo para la dentina (Marending, Luder, Brunner, et al., 2007, citados en Du, y otros, 2014).

El NaOCl tiene acción bactericida (Foley, Weine, Hagen & deObarrio, 1983, citados en Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013) y posee amplio espectro (elimina todos los microbios) (Siqueira, Batista, Fraga & de Uzeda, 1998, citados en Almeida, y otros, 2014) con acción no específica (Hülsmann, Rödiger & Nordmeyer, 2007, citados en Basrani & Haapasalo, 2012). Es efectivo contra biofilms, es esporocida y virucida y tiene mayor efecto en disolver tejido necrótico que tejido vivo (Valera, Silva, Maekawa, Carvalho, Koga-Ito, Camargo & Lima, 2009, citados en Rahimi, y otros, 2014). Su efecto antimicrobiano depende

de la concentración y el tiempo (Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). Aunque incluso a bajas concentraciones tiene efecto contra bacterias resistentes como *E. faecalis* y *C. albicans* (Siqueira, Rocas, Favieri & Lima, 2000, citados en Retamozo, Shabahang, Johnson, Aprecio, & Torabinejad, 2010).

Los estudios demuestran que es efectivo en reducir el número y diversidad de bacterias inmediatamente tras la instrumentación (Rocas & Siqueira, 2010, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). Sin embargo, permite su recolonización si se deja al conducto vacío (Byström & Sundqvist, 1985; Menezes, y otros, 2004). Esto se debe a que el hipoclorito de sodio a varias concentraciones y a varios tiempos de exposición puede penetrar en túbulos entre 77 y 330 μm (Zou, Shen, Li, et al., 2010, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010); mientras que se ha reportado que bacterias como el *E. faecalis* penetran hasta 1000 μm (Haapasalo & Orstavik, 1987, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010).

En general, la mayoría de estudios apoya que se requiere de altas concentraciones (5.25%) y tiempo prolongado de irrigación (30 a 40 minutos) para desinfectar los túbulos y acabar con la infección por *E. faecalis*. No obstante, no se han obtenido túbulos 100% libres de bacterias (Du, y otros, 2014; Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010).

El empleo de hipoclorito de sodio tiene algunas desventajas. Entre ellas está el hecho que no humedece bien la dentina. También, proporciona una irrigación defectuosa en conductos pequeños y ramificaciones (Cohen & Burns, 2002) y se ha reportado que ciertas bacterias penetran más profundo en dentina de lo que el hipoclorito puede llegar. (Retamozo, Shabahang, Johnson, Aprecio, & Torabinejad, 2010). Igualmente, disminuye los compuestos orgánicos de la dentina (Pascon, Kantovitz, Sacramento, et al., 2009, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010), módulo de elasticidad, fuerza flexural, contenido de nitrógeno y carbón (Cohen & Burns, 2002; Marending, Luder, Brunner, et al., 2007, citados en Du, y otros, 2014) y aumenta significativamente la permeabilidad de la misma (Cohen & Burns, 2002). Esto

reduce la resistencia de los dientes a la fractura. De forma semejante, se ha encontrado una interferencia negativa en los procesos adhesivos restauradores (Farina, Cecchin, Barbizam & Carlini, 2011, citados en Almeida, y otros, 2014; Pascon, Kantovitz, Sacramento, et al., 2009, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010).

La dentina se ve afectada, principalmente, porque se degradan sus componentes orgánicos (Pascon, Kantovitz, Sacramento, et al., 2009, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). Si se irriga con una concentración de 5.25% por un minuto, se reduce la microdureza (Saleh & Ettman, 1999, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010); por 10 minutos, se reduce fuerza de adhesión con poste (da Cunha, Furuse, Mondelli, Mondelli, 2010, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010); por dos horas, se reduce la fuerza flexural y el módulo de elasticidad (Sim, Knowles, Ng, et al., 2001, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). Por su parte, si se irriga con una concentración de 2.5% por 24 minutos, se disminuye la fuerza flexural (Marending, Paque, Fischer & Zehnder, 2007, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). Finalmente, si se irriga con una concentración de 1% por 15 minutos, se reduce la microdureza (Oliveira, Carvalho, Nunes, et al., 2007, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010).

Si bien se ha reportado que la desproteínización de la dentina es dependiente del tiempo en forma lineal (Zhang, Tay, Kim, et al., 2010, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010), parece que el grado de desproteínización depende de la concentración, al menos en los primeros 10 minutos (Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). Esto se debe a que el hipoclorito de sodio remueve componentes orgánicos pero no influencia la fase inorgánica de la dentina. Así, el colágeno expuesto en superficies dentinarias se une fácilmente y es removido por hipoclorito. No obstante, el NaOCl no puede alcanzar el colágeno encapsulado por hidroxiapatita (Di Renzo, Ellis, Sacher, et al., 2001, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010).

Por otro lado, la extrusión de hipoclorito de sodio en tejidos perirradiculares produce reacciones severas (Soares & Goldberg, 2007; Torabinejad & Walton, 2010). Entre ellas, dolor intenso, hemorragia periapical y tumefacción intensa. El dolor cede en 2 a 3 días y la tumefacción es más severa en el primer día. No obstante, el pronóstico bueno (Cohen & Burns, 2002).

EDTA

Durante el modelado se acumulan restos orgánicos e inorgánicos que forman una capa superficial amorfa e irregular conocida como barrillo dentinario (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010). Esta capa tiene entre 1 y 15µm de espesor, puede penetrar en los túbulos a una profundidad variable y, en necrosis, se encuentra contaminada (Torabinejad & Walton, 2010). Debido a la oclusión de los túbulos dentinarios, el hipoclorito de sodio no puede acceder para eliminar el tejido remanente y desinfectar (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010). Es así que, si no se elimina, puede desintegrarse lentamente por la filtración de los materiales de obturación o deshacerse por ácidos y enzimas de bacterias viables (Torabinejad & Walton, 2010).

Por estas razones, es necesario remover dicho barrillo, para lo cual se emplean sustancias quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 17%) que disuelve los componentes inorgánicos del barrillo dentinario (Cohen & Burns, 2002; Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010). Es así que, al remover la capa de barrillo dentinario, se permite una limpieza eficaz por el incremento de la permeabilidad tubular (Soares & Goldberg, 2007). También, aumenta la adhesión por mayor penetración en túbulos (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010). Esto, a su vez, lleva a una mejor obturación, de los conductos laterales en especial (Soares & Goldberg, 2007). De esta forma, se limitan las filtraciones coronales y apicales (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010).

Los quelantes son compuestos que tienen la capacidad de fijar con firmeza iones metálicos. Esto se debe a los varios enlaces químicos que su molécula puede establecer con un mismo ión metálico, secuestrándolo del medio. Al remover iones de calcio de los tejidos duros, como la dentina, se promueve su desmineralización y, en consecuencia, la reducción de su dureza. Esto es útil no solo para la remoción de barrillo dentinario, sino también para iniciar la conformación de conductos estrechos ya que las paredes dentinarias se tornan menos resistentes a la acción de los instrumentos (Soares & Goldberg, 2007).

El EDTA es el quelante más empleado en endodoncia y se lo utiliza más comúnmente en forma de solución (Soares & Goldberg, 2007). La sal disódica de EDTA al 17% y pH neutro es la preferida (Serper & Calt, 2002). Sin embargo, se puede agregar hidróxido de sodio y conseguir una sal trisódica más soluble y con pH de 7.3. También, se emplea como pasta, asociado a peróxido de urea (antiséptico); no obstante, su pH es ácido y tiene un tercio de poder desmineralizante del líquido. En consecuencia, la pasta se emplea como lubricante (Soares & Goldberg, 2007).

Los lubricantes son de gran ayuda durante el acceso inicial ya que reducen las fuerzas de torsión que actúan sobre las limas. Cuando contienen sustancias quelantes, pueden atrapar restos de dentina y evitar su compactación en apical. No obstante, este tipo de productos tiene el inconveniente de desactivar el NaOCl al reducir el cloro disponible y son potencialmente tóxicos. Además, no se ha podido demostrar que el uso de quelantes en los lubricantes aumente su eficacia (Torabinejad & Walton, 2010).

A pesar de estas limitaciones como lubricante, en general, se considera que el EDTA tiene acción autolimitante, es biocompatible, antiséptico y no presenta contraindicaciones. Por ello, se lo puede usar en biopulpectomía y en necropulpectomía (Soares & Goldberg, 2007). Por otro lado, se ha encontrado que el EDTA tiene potencial antimicrobiano contra microorganismos en biofilms. Aunque no es claro el mecanismo, se piensa que el efecto

quelante sobre el calcio y el hierro puede afectar vías metabólicas importantes en las bacterias. Sin embargo, parece que su difusión es dependiente del tiempo (Root, McIntyre, Jacobs, et al., 1988, citados en Chávez de Paz, Bergenholtz, & Svensater, 2010).

La eficacia del EDTA depende de muchos factores. Entre ellos la longitud del conducto, la penetración del material, la dureza de la dentina, la duración de la aplicación, el pH y la concentración (Sen, Wesselink & Turkun, 1995, citados en Serper & Calt, 2002). Además, cuando se emplea junto con hipoclorito de sodio, produce efervescencia que se suma a la acción desmineralizante propia del quelante (Soares & Goldberg, 2007).

Existen varias recomendaciones con respecto a su empleo. En el caso de la conformación de conductos atrésicos, se deben inundar los conductos con EDTA, utilizando un lima delgada para ayudar su inserción. Seguido, se debe agitar con el instrumento y esperar dos a tres minutos antes de iniciar la conformación (Soares & Goldberg, 2007).

Por su lado, para la remoción del barrillo dentinario, existen discrepancias sobre el volumen y el tiempo de acción. Soares y Goldberg (2007), aconsejan irrigar el conducto con 5mL de EDTA una vez concluida la conformación. El conducto debe quedar lleno por 3 a 5 minutos. Seguido, puede irrigarse con NaOCl y secarse con conos de papel. No obstante, otros autores, recomiendan irrigar con EDTA al 17% por un minuto y enjuagar con NaOCl (Cohen & Burns, 2002; Torabinejad & Walton, 2010). Es más, se ha reportado remoción completa de barrillo por 1mL de EDTA al 17% por un minuto, seguido de 3mL de NaOCl al 5.25%, aunque no siempre se obtiene este resultado (Crompton, Goodell & McClanahan, 2005, citados en Khedmat & Shokouhinejad, 2008). En general, el EDTA debe sustituirse con irrigación recurrente y puede descalcificar hasta 50um de dentina (Cohen & Burns, 2002).

Algo en lo que la mayoría de los autores están de acuerdo es en que su acción es más eficaz en tercios medio y cervical, en comparación con apical (Khedmat & Shokouhinejad, 2008). Esto se debe al mayor tamaño de conductos en los tercios más coronales (Torabinejad

& Walton, 2010). No obstante, se ha encontrado que la remoción de barrillo apical mejora con ultrasonido por un minuto (Kuah, Lui, Tseng, & Chen, 2009) ya que la solución colocada con aguja solo penetra 1mm más allá de la punta (Abou-Rass & Piccinini, 1982, citados en Kuah, Lui, Tseng, & Chen, 2009). Aunque también se ha sostenido que la acción de EDTA depende del tiempo de contacto y que no debe ser agitado (Lopes, Siqueira-Junior & Elias, 2004, citados en Menezes, Gadê-Neto, Dametto, de M. Sarmiento, & Andrade, 2011)

Al igual que toda sustancia, el EDTA posee algunas desventajas. Por ejemplo, a pesar de ser considerado biocompatible, su comportamiento depende de la forma en que contacta con el tejido. Cuando se introduce en tejido subcutáneo en animales provoca exudado severo y hemorragia. Esto se debe a que captura el calcio necesario para la integridad de la pared de los vasos y la coagulación. No obstante, su uso correcto no produce estos efectos (Soares & Goldberg, 2007).

Igualmente, al existir información contradictoria sobre el tiempo de aplicación, puede existir una desmineralización excesiva de la dentina. Es así que algunos estudios indican que debe permanecer hasta 15 minutos y que el proceso descalcificador es autolimitado (Cohen & Burns, 2002); mientras que muchos concuerdan en que la permanencia por 10 minutos causa supresión excesiva de dentina peritubular e intratubular (Serper & Calt, 2002; Torabinejad & Walton, 2010). Es más, se considera que la aplicación de EDTA por más de un minuto y más de 1mL produce erosión dentinaria (Tay, Gutmann & Pashley, 2007, citados en Khedmat & Shokouhinejad, 2008).

Finalmente, el uso de agentes quelantes reduce la hidrofobicidad y la energía superficial de la dentina radicular (Dogan, Calt & Gumusderelioglu, 2007, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010), influenciando la naturaleza de la adhesión bacteriana, fuerza de adhesión y formación de biofilm de *E. faecalis* (Kishen, Sum, Mathew & Lim, 2008, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). Esto se debe a la

remoción selectiva de componentes inorgánicos de la dentina, que expone fibras de colágeno y crea un sustrato ideal para la adhesión de *E. faecalis* (Haapasalo, Qian, Portenier & Waltimo, 2007, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010).

Obturación

Ya que la completa desinfección de los conductos es clínicamente imposible, es necesario obturarlos para crear un ambiente inhóspito para la supervivencia de bacterias remanentes. Esto se logra mediante una obturación tridimensional con buen sellado apical y coronal. De esta forma, se limitan los nutrientes, el espacio y se cambian las condiciones redox (Fouad, 2009).

Restauración

Tanto durante como una vez terminado el tratamiento, es necesaria la colocación de una restauración coronal para prevenir la filtración de bacterias provenientes del medio oral. Así, durante el tratamiento, se debe colocar un material provisional de fácil remoción pero resistente para mantenerse en boca entre citas. Por otro lado, la restauración definitiva debe mantener el selle coronal y ser resistente a las fuerzas masticatorias por largos periodos de tiempo (Fouad, 2009).

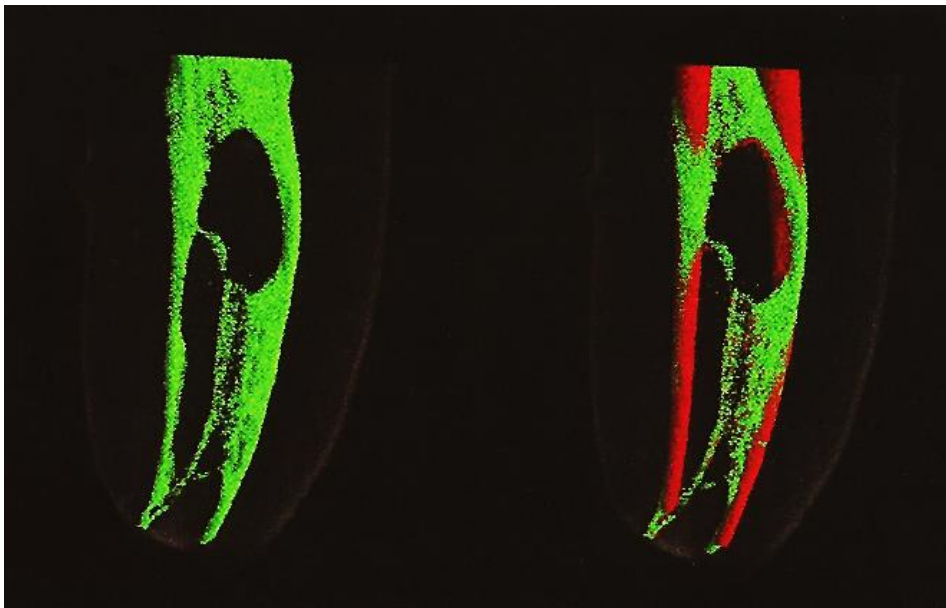
Fracaso del tratamiento convencional

Existen varias razones para el desarrollo de una lesión periapical tras un tratamiento endodóncico. La primera es la reinfección del canal por bacterias residuales o microfiltración, causa más común (Fouad, 2009). La segunda es colonización bacteriana en el exterior de la raíz por bacterias como *Actinomyces* y *Propionibacterium* (Fouad, 2009; Torabinejad & Walton, 2010). Finalmente, se encuentra la presencia de un quiste. En el primer caso, el error

se encuentra en algún paso del proceso de instrumentación-irrigación o restauración. Por otro lado, en los otros dos casos, el tratamiento convencional resulta insuficiente y es necesario recurrir a cirugía periapical (Fouad, 2009).

Cabe señalar que la presencia de condiciones anatómicas al interior de los conductos es una razón importante para el fracaso de su tratamiento. Entre ellas las reabsorciones periapicales, istmos, socavados y canales accesorios. También, como ya se ha mencionado antes, la penetración bacteriana en los túbulos dentinarios constituye una variable importante. Tales variaciones anatómicas suelen ser pasadas por alto al momento de la instrumentación por la dificultad asociada a acceder a ellas (figura 1) (Fouad, 2009).

Figura 1. Tomografía microcomputarizada de un primer molar previo (izq) y tras (der) la instrumentación. Áreas verdes sin instrumentar.



Fouad, A. (2009). *Endodontic Microbiology*. Baltimore: Wiley-Blackwell.

Durante el tratamiento se reduce la cantidad de bacilos gram-negativos y aumenta la de cocos facultativos gram-positivos, considerados las especies más resistentes. En consecuencia, la microflora consiste principalmente de anaerobios facultativos gram positivos con una a tres especies por canal (Torabinejad & Walton, 2010). En general, se encuentran

enterococos, estreptococos, peptoestreptococos, actinomicos y levaduras. Entre las cepas más comunes se encuentran *E. faecalis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *P. micra*, *A. naeslaundi* y *P. intermedia* con capacidad de invadir los túbulos dentinarios como monocultivo. También, se han aislado *Cándida ábicans* y bacterias no cultivables (Fouad, 2009).

Así, existe una fuerte correlación entre la presencia de bacterias al momento de la obturación y el desarrollo de lesión periapical (Fouad, 2009). En general, entre el 30% y 90% de los dientes endodonciados con lesión periapical presenta *E. faecalis* y entre el 3% y 18% *C. albicans*. Éstos presentan varios mecanismos de resistencia al tratamiento convencional. Por esta razón, aparecen como los más relevantes en los fracasos endodóncicos (Torabinejad & Walton, 2010).

Enterococcus faecalis

Los *Enterococos* son un género de cocos gram-positivos anaerobios facultativos (Fouad, 2009). En general, son bacterias comensales (Jett, Huycke & Gilmore, 1994, citados en Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009), tienen forma ovoide, se presentan solos, en pares o en cadenas cortas y pueden crecer en temperaturas entre 10-45°C. El *E. faecalis* es una de las especies más comunes en humanos (Fouad, 2009), siendo un habitante normal de la cavidad oral (Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011) gastrointestinal y genital (Jett, Huycke & Gilmore, 1994, citados en Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009). No obstante, puede producir complicaciones como periodontitis apical o, inclusive, endocarditis (Fouad, 2009).

Con respecto a las infecciones endodóncicas, el *E. faecalis* es la especie más común en dientes que requieren retratamiento con lesión periapical persistente y asintomática (Fouad, 2009; Pavaskar, y otros, 2012). Así, se ha encontrado presente en un 77% (Siqueira, Rocas, 2004, citados en Pavaskar, y otros, 2012) de los fracasos en tratamiento endodóncico y en un 50% de los casos con periodontitis apical crónica (Peciuliene, Reynaud, Balciuniene &

Haapasalo, 2001, citados en Pavaskar, y otros, 2012). Esto hace sospechar que esta bacteria es capaz de persistir en el ambiente hostil de los conductos instrumentados y obturados, con espacio y nutrientes escasos (Fouad, 2009). Por otro lado, raras veces aparece en infección primaria y, en caso que lo hiciese, puede explicarse como una consecuencia de colonización coronal después de ingestión de comida contaminada (Siqueira, 2001, citado en Pavaskar, y otros, 2012).

Normalmente, se presenta como monoinfección, aunque también puede aparecer en infecciones mixtas (George, Kishen & Song, 2005, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). En estudios en monos, el *E. faecalis* como monocultivo solo causa una reacción periapical de bajo grado y su recuperación de conductos tratados era más probablemente asociada a un periápice sano. Igualmente, se ha encontrado que solo cuando en *E. faecalis* se presenta con otras especies, en una colección de unas ocho cepas, la lesión es grande. Es así que cuando se ha agregado *E. faecalis* a otras bacterias, se produce una mayor supervivencia de las mismas. Sin embargo, cuando varias bacterias se inocularon en canales de monos, solo el *E. faecalis* se recuperó de todas las muestras tras 8-12 meses. Todas presentaron lesión periapical, incluso en las que se recuperó como monocultivo. Por otro lado, se ha hipotetizado que el daño al tejido periapical puede deberse más a la respuesta del huésped que al daño directo de las bacterias. (Fouad, 2009).

Distintos factores influyen en el grado de patogenicidad de las bacterias al interior de los conductos. Entre ellos la disponibilidad de nutrientes endógenos o exógenos, la tensión de oxígeno, pH y la superficie de adherencia (Fouad, 2009). En consecuencia, la virulencia del *E. faecalis* se debe a la presencia de genes de resistencia, su alta capacidad de soportar condiciones extremas, su adhesión a dentina y a la formación de biofilm (Fouad, 2009).

El *E. faecalis* presenta transducción, que consiste en transferencia de genes por medio de virus bacteriófagos. De esta forma, se pasan los genes virulentos entre células. Así, las

bacterias se pueden adaptar rápidamente. También, posee plásmidos o material genético extracromosomal con distintas funciones estructurales y virulentas. Algunos plásmidos transmiten copias de sí mismos empleando péptidos pequeños conocidos como feromonas sexuales. Éstas inducen a la formación de adhesinas que permiten la unión entre células para que la conjugación tenga lugar. En base a esto, se puede notar que los plásmidos son un medio importante de transmisión de resistencia antibiótica y de otros factores de virulencia. Entre estos factores se encuentran la producción de citotoxinas, adhesinas y enzimas metabólicas (Fouad, 2009). No obstante, las feromonas sexuales empleadas por *E. faecalis* producen quimiotaxis de neutrófilos humanos (Laurence & Basil, 2008, citados en Bolla, Raj, Iswarya, Vemuri, & Shenoy, 2012).

Por su parte, la cepa MC4 de *E. faecalis* contiene plásmidos que le confieren resistencia a cloranfenicol, estreptomicina y tetraciclina. Los estudios arrojan que, aproximadamente, existen cuatro plásmidos por cepa, diferentes entre cepas. Es más, se ha demostrado una transferencia bidireccional entre *E. faecalis* y *S. gorgonii* del gen resistente a la eritromicina pAM81 (Fouad, 2009). Igualmente, se sabe que el *E. faecalis* es intrínsecamente resistente a la clindamicina hidrocloreuro (ADM, 2009, citado en Bolla, Raj, Iswarya, Vemuri, & Shenoy, 2012). De forma semejante, se ha recuperado una mayor cantidad de la cepa productora de gelatinasa OG1RF de conductos contaminados, en comparación con la cepa no productora de gelatinasa TX5128. Por otro lado, la habilidad del *E. faecalis* para sobrevivir un pH de 10 se ha asociado con un aumento de 37 veces en transcriptores de gen *ftsZ*, asociado a la división celular (Fouad, 2009).

En general, las sustancias virulentas producidas por *E. faecalis* son: proteína de superficie de enterococo (Esp), proteína de unión a colágeno (Ace), antígeno de endocarditis (EfaA), substancia de agregación (AS), factores de secreción de proteasas (gelatinasa) y toxinas (citolisina) (Fouad, 2009; Laurence & Basil, 2008, citados en Bolla, Raj, Iswarya,

Vemuri, & Shenoy, 2012; Sedgley, Molander, Flannagan, Nagel, Appelbe, Clewell, et al., 2005, citados en Sponchiado, Pereira, Marques, da Fonseca, & França, 2014). Proteasa serina y Ace contribuyen a la adhesión a dentina y la resistencia a neutrófilos es proporcionada por AS. Igualmente, ciertas citotoxinas presentes en plásmidos pueden lisar eritrocitos y otras células eucariotas (Fouad, 2009).

Al ser una bacteria gram-positiva, la presencia de péptidoglicano es una gran fuente de resistencia. Éste refuerza a la célula y mantiene la presión osmótica citoplasmática. El péptidoglicano se encuentra en forma de red en el exterior de la membrana plasmática (Fouad, 2009). El ácido lipoteicoico es otro componente de la pared celular y es uno de los mayores factores etiológicos de la inflamación, además de encontrarse asociado a la penetración tubular (Baik, Ryu, Han, et al., 2008, citados en Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009). Asimismo, el *E. faecalis* es capaz de entrar y salir de un estado viable pero no cultivable que presenta alteraciones en la pared celular que pueden proveer de protección bajo circunstancias no favorables (Bystrom & Sunquist, 1981, citados en Bolla, Raj, Iswarya, Vemuri, & Shenoy, 2012).

De esta manera, se piensa que las bacterias en estado de inanición al interior de los túbulos activan varios mecanismos y logran colonizar este ambiente inhóspito (Fouad, 2009). Así, se ha determinado que el *E. faecalis* puede sobrevivir en medio hipotónico o hipertónico, en un pH entre 2 y 11.1 y con pocos nutrientes (Evans, Davies, Sundqvist & Figdor, 2002, citados en Sponchiado, Pereira, Marques, da Fonseca, & França, 2014; Minana, Carner & Walker, 2001, citados en Puneetha, Champa, & Panchajanya, 2014). Su tolerancia a un pH muy elevado le confiere resistencia al hidróxido de calcio. Esto se debe a que posee una bomba de protones en su interior, que acidifica su citoplasma si aumenta la alcalinidad del ambiente (Fouad, 2009). En dentina intratubular, el pH alcanza 10.3, mientras que se requiere de un pH de 11.5 para que la bacteria muera (Minana, Carner & Walker, 2001, citados en

Puneetha, Champa, & Panchajanya, 2014). La resistencia al hidróxido de calcio también se ha relacionado a su unión al colágeno, lo cual a su vez le proporciona resistencia a la mayoría de medicamentos (Kayaoglu, Erten, Bodrumlu & Ørstavik, 2009, citados en Pavaskar, y otros, 2012). Igualmente, puede formar biofilm en canales con este medicamento (Fouad, 2009).

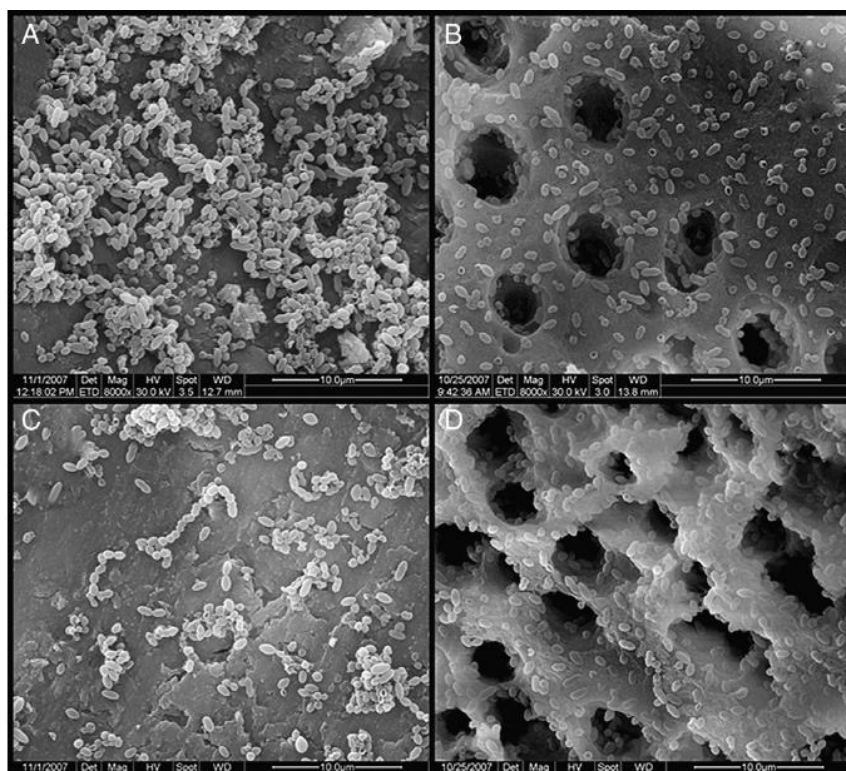
Bajo condiciones de escasas de nutrientes, muestra resistencia al hipoclorito de sodio, al calor, al peróxido de hidrógeno, al ácido y al etanol. Igualmente, sobrevive por largos periodos solo en agua, en túbulos dentinarios llenos de agua y en suero humano, que semejan al tipo de nutrientes disponibles en el sistema de conductos tras el tratamiento (Fouad, 2009). Estos nutrientes parecen provenir del líquido tisular del ligamento periodontal y del hueso alveolar (Pinheiro, Gomes, Ferraz, Sousa, Teixeira & Souza-Filho, 2003, citados en Marques, y otros, 2014). Es más, el *E. faecalis* sobrevive en túbulos dentinarios por al menos 10 días sin nutrientes (Siqueira, 2001, citado en Pavaskar, y otros, 2012).

Este organismo es el que más rápidamente invade los túbulos y que puede sobrevivir ahí la mayor cantidad de tiempo (Orstavik & Haapasalo, 1990, citados en Dammaschke, Jung, Harks, & Schafer, 2013). Los mecanismos de adhesión de las bacterias a superficies sólidas son influenciados por las propiedades de la superficie y las capacidades de adhesión únicas de la bacteria (Steinberg, 2000, citado en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). Así, se ha sugerido que la adhesión bacteriana ocurre en dos fases. La primera, es un proceso físico-químico que ocurre en segundos y minutos; mientras que la segunda es un proceso biológico celular-molecular de biofilm maduro, ocurriendo en horas y días (Kishen, Sum, Mathew & Lim, 2008, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010).

La dentina es el sustrato principal para adhesión bacteriana (Portenier, Waltimo & Haapasalo, 2003, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). Los túbulos dentinarios poseen una cantidad apreciable de colágeno no mineralizado (Marshall, 1993, citado en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). No obstante, hay un

conocimiento limitado sobre los cambios en colágeno con el envejecimiento (Ozgun, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). Por su parte, se ha reportado que pierde su extensibilidad y que hay menor cantidad dependiendo de la edad (Nazari, Bajaj, Zhang, Romberg & Arola, 2009, citados en Ozgun, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). Esto influencia la forma en la que se adhiere el *E. faecalis* (figura 2) (Ozgun, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010).

Figura 2. Adhesión de *E. faecalis* a dentina humana vieja y joven, con y sin barrillo dentinario (microscopio de escaneo electrónico 3000X).



Ozgun, H., Dogan, H., Calt, S., Stabholz, A., & Steinberg, D. (May de 2010). Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite Irrigation on Enterococcus faecalis Biofilm Colonization in Young and Old Human Root Canal Dentin: *In vitro* Study. *Journal of Endodontics*, 36(5), 842-846.

A y B. Dentina vieja, C y D. Dentina joven, A y C. Presencia de barrillo dentinario, B y D. Sin presencia de barrillo dentinario.

Igualmente, el tiempo de exposición de la dentina a la bacteria y el diámetro de los túbulos dentinarios pueden jugar un papel importante en la penetración tubular. Así, túbulos escleróticos u obliterados pueden impedir la invasión de forma física. Por ejemplo, los túbulos en dentina vieja pasan de $2.5\mu\text{m}$ a $0.9\mu\text{m}$ cerca de la unión cemento-esmalte. Esto hace que la penetración de *E. faecalis* sea menor. No obstante, el *E. faecalis* promedio mide de 0.8 a $1\mu\text{m}$ (Rigden, Baier, Ramirez-Arcos, Liao, Wang & Dillon, 2009, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010).

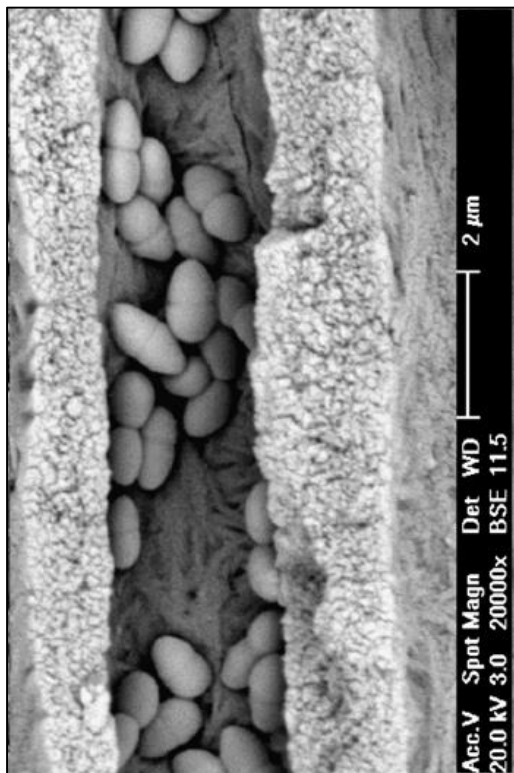
También, parece que la unión a *E. faecalis* puede relacionarse a interacciones no específicas basadas en propiedades de superficie antes que una unión específica al colágeno. Así, alteraciones en la dentina pueden resultar en diferente capacidad de adhesión (Yang, Cha, Kim, Kum, Lee & Jung, 2006, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). El empleo de NaOCl 2.5% y EDTA reduce significativamente la adhesión de *E. faecalis* en dentina joven y vieja, aunque esta reducción de adhesión es menor en dentina vieja. Esto puede deberse a que hay un mayor contenido de minerales y colágeno en dentina vieja (Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010).

Así, el EDTA reduce la hidrofobicidad y la energía superficial libre de la dentina (Dogan, Calt & Gumusderelioglu, 2007, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010) y modifica adhesión de *E. faecalis*. Sin embargo, hay menos adhesión bacteriana cuando irrigante final es NaOCl porque el EDTA expone colágeno (Kishen, Sum, Mathew & Lim, 2008, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). A pesar de ello, se ha observado que ambos agente reducen la adhesión si se empleaban solos, aunque no tanto como combinados (Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010).

Por otro lado, la capacidad del *E. faecalis* de reproducirse en capas profundas de dentina, istmos y ramificaciones facilita su colonización ya que evade el contacto con

irrigantes y medicamentos a la concentración necesaria. Igualmente, se encuentra la capacidad amortiguadora de la dentina que también interfiere con la eficacia de medicamentos (Love, 2001, citado en Lucena, y otros, 2013). Además, sobrevive en barrillo dentinario (figura 2A y C) (Estrela C, Estrela CRA, Decurcio, Hollanda & Silva, 2007, citados en Pavaskar, y otros, 2012; Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). Así, la infección de dentina humana por cuatro semanas alcanza una profundidad de al menos 300 μ m (Lucena, y otros, 2013). No obstante, se ha reportado que puede penetrar hasta una profundidad de 1000 μ m en modelos *in vitro* (Haapasalo & Orstavik, 1987, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). De esta forma, invade los túbulos como biofilm organizado (figura 3) (Chivatxaranukul, Dashper & Messer, 2008, citados en Marques, y otros, 2014).

Figura 3. Penetración tubular de *E. faecalis* (microscopio de escaneo electrónico 20000X).



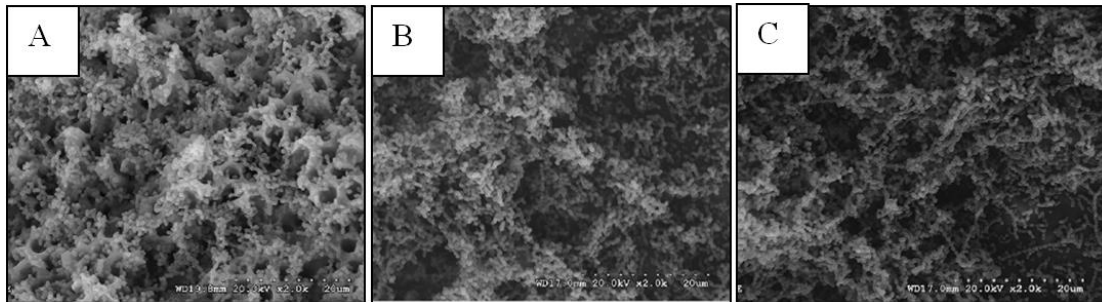
Longhi, G., Guzzo, J., Jardim, W., Dias, S., & Poli, J. (August de 2011). Effect of Ultrasonics on *Enterococcus faecalis* Biofilm in a Bovine Tooth Model. *Journal of Endodontics*, 37(8), 1128-1133.

Un biofilm es 1000 veces más resistente a la fagocitosis, los anticuerpos y los antimicrobianos que las bacterias planctónicas (Stuart, Schwartz, Beeson, et al., 2006, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). Sin embargo, existen diferencias en las características del biofilm según su tiempo de formación. Es así que las bacterias en un biofilm joven (un día de formación) son más susceptibles que las de un biofilm maduro (tres semanas de formación). Esto se debe a que más bacterias se encuentran activas y en crecimiento exponencial; también, el desarrollo estructural del biofilm todavía no se ha completado. Por ejemplo, la matriz polimérica extracelular no se encuentra lista. Lo contrario sucede con el biofilm maduro que presenta células en estado viable pero no cultivable persistentes y una barrera física de la matriz polimérica extracelular proporcionándole una mayor resistencia (Du, y otros, 2014).

También, dependiendo si el ambiente es alto en nutrientes, bajo en nutrientes, aeróbico o anaeróbico se forma una distinta ultraestructura de biofilm. Por ejemplo, el biofilm de *E. faecalis* se calcifica mientras madura, en especial en ambientes anaeróbicos y bajos en nutrientes. Por otro lado, hay mayor penetración bacteriana en ambientes ricos en nutrientes (George, Kishen & Song, 2005, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). Es así que el *E. faecalis* en fase de inanición (figura 4A) y en fase estacionaria (figura 4C) puede formar biofilm con menos eficacia que en fase exponencial (figura 4B). No obstante, esta capacidad de formar biofilm permanece estable en el tiempo en cualquiera de las fases (Lleo, Bonato, Tafi, et al., 2007, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). La fase de inanición es

probablemente el estado de las células en casos de retratamiento (Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012).

Figura 4. Formación de biofilm de *E. faecalis* a las 24 horas en sus distintas fases (microscopio de escaneo electrónico 2000X)



Liu, H., Wei, X., Ling, J., Wang, W., & Huang, X. (April de 2010). Biofilm Formation Capability of Enterococcus faecalis Cells in Starvation Phase and Its Susceptibility to Sodium Hypochlorite. Journal of Endodontics, 36(4), 630-635.

La formación de biofilm en inanición se da a través de las fases típicas de adherencia inicial al sustrato, formación de microcolonias y maduración en una estructura tridimensional (Kristich, Li, Cvitkovitch, et al., 2004, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). Sin embargo, parece ser más dependiente de la adhesión entre células antes que a la cantidad inicial de células unidas a la superficie (Cerca, Pier, Vilanova, et al, 2005, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). También, señales ambientales y rutas regulatorias tienen influencia (Stanley & Lazazzera, 2004, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). Así, la represión catabólica, el cambio de *fsr* y la producción de proteasas mediadas por un regulador transcripcional dependiente de la glucosa pueden ser las razones de una menor formación de biofilm en estado de inanición (Pillai, Sakoulas, Eliopoulos, et al., 2004, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). Por otro lado, la hidrofobicidad y adherencia de *E. faecalis* a dentina aumentan significativamente durante la inanición (George & Kishen, 2007, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010).

En estado planctónico, la inanición lleva a un aumento en la resistencia de *E. faecalis* a estrés químico, osmótico y oxidativo. Es así que, en este estado, las células sobreviven 1000 a 10.000 veces más cuando son expuestas a NaOCl, comparadas con la fase exponencial (Portenier, Waltimo, Ørstavik, Haapasalo, 2005, citados en Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012). Como es de esperarse, la susceptibilidad del biofilm formado con células en estado de inanición disminuyó con la maduración del biofilm. Sin embargo, se considera que los biofilms en estado de inanición y en estado exponencial son los más resistentes a NaOCl al 5.25% (Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010), aunque otro estudio ha reportado que las células en estado estacionario fueron más resistente que en exponencial (Portenier, Waltimo, Ørstavik, & Haapasalo, 2005).

Varios factores pueden ser la razón del aumento en resistencia. Primero, las células en lo profundo del biofilm reducen su crecimiento en respuesta a la escasez de nutrientes y aumentan su resistencia a agentes antimicrobianos (Mah, O'Toole, 2001, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). Segundo, fenotipos de unión específicos pueden desarrollarse al interior del biofilm (Lo, Seers, Boyce, et al., 2009, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). Es así que se supone que en estado de inanición se liberan productos orgánicos intercelularmente que pueden tener un rol en la inactivación de medicamentos (Portenier, Waltimo, Ørstavik & Haapasalo, 2005, citados en Awawdeh, AL-Beitawi, & Hammad, 2009). Finalmente, la estructura física o química de exopolisacáridos u otras partes de la arquitectura del biofilm confieren resistencia al excluir los biocidas de la comunidad bacteriana (Mah & O'Toole, 2001, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). A las 24 horas de formación del biofilm hay muy pocos exopolisacáridos y su presencia se consolida tras 36 horas (Santos, Arruda, Carvalho, et al, 2008, citados en Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). El aumento en la resistencia del biofilm tras 48 horas puede ser en parte a la presencia de estas sustancias (Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010).

Con respecto a los tratamiento, el empleo de gel de clorhexidina al 2% entre 1 y 14 días ha probado ser efectivo en remover *E. faecalis* hasta una profundidad de 400µm (Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012; Jayasimha & Mylswamy, 2011; Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007; Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011). En contacto directo, le toma a la clorhexidina al 0.2% 15 minutos en eliminar células en estado planctónico (Abdullah, Ng, Gulabivala, Moles & Spratt, 2005, citados en Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009).

Por otro lado, se ha propuesto a la irrigación de NaOCl al 1% es capaz de eliminar el biofilm de *E. faecalis* de forma adecuada ya sea mediante irrigación convencional u ultrasónica (Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013; Bhuva, y otros, 2010). No obstante, varios autores no consideran que se consigue un nivel de desinfección aceptable (Almeida, y otros, 2014; Brito, y otros, 2009; Harrison, Chivatxaranukul, Parashos, & Messer, 2010; Menezes, Gadê-Neto, Dametto, de M. Sarmiento, & Andrade, 2011). Por consiguiente, se ha propuesto que en altas concentraciones, el NaOCl parece ser más efectivo contra *E. faecalis* que la clorhexidina al 2%, aunque ninguno de estos métodos puede eliminar completamente las bacterias de los túbulos (Du, y otros, 2014).

El porcentaje de *E. faecalis* en biofilm de un día que mata el NaOCl al 6% es de 35% tras un minuto y de 61% tras tres minutos (Wang Z, Shen Y, Haapasalo M., 2012, citado en Du, y otros, 2014). Esto es menos efectivo en un biofilm de tres semanas. Es así que se propone que la forma más efectiva de eliminar este biofilm es con 40 minutos de NaOCl al 5.25%. No obstante, se ha encontrado que no hay mayor aumento de desinfección tras la aplicación del desinfectante por 10 minutos (Retamozo, Shabahang, Johnson, Aprecio, & Torabinejad, 2010).

Por su parte, se ha encontrado que el hidróxido de calcio puede inhibir al *E. faecalis* en el interior de los túbulos en la primeras 72 horas y su efecto reduce gradualmente (Pavaskar, y

otros, 2012). Por su parte, el extracto de *Pothomorphe umbellata* que ha probado ser igual de efectivo que el hidróxido de calcio tras 7, 14 y 28 días con un 100% de eliminación de *E. faecalis* en conducto principal (Sponchiado, Pereira, Marques, da Fonseca, & França, 2014). No obstante, el linezolid, neem y propolis al 30% son más efectivos que el hidróxido de calcio (Awawdeh, AL-Beitawi, & Hammad, 2009; Pavaskar, y otros, 2012; Puneetha, Champa, & Panchajanya, 2014).

Por otro lado, el hidróxido de calcio con propilenglicol y la clorhexidina son igual de efectivos contra *E. faecalis* (Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011). Semejante, La doxiciclina al 3% es igual de efectiva que la clorhexidina (Marques, y otros, 2014). Por su parte, el aceite ozonizado es más efectivo que el hidróxido de calcio con paramonoclorofenol alcaforado en modelo animal *in vivo*, produciendo un 77% de resolución de la lesión periapical (Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007).

Un estudio en difusión en agar muestra odontopaste (50mg de clindamicina al 5%, 10mg de triamcinolona acetona y 0.5-1% hidróxido de calcio) es más efectivo que clorhexidina y propolis en inhibir *E. faecalis* (Bolla, Raj, Iswarya, Vemuri, & Shenoy, 2012). También, la pasta de acción antibiótica triple (metronidazol, ciprofloxacina y minociclina) es mejor que la clorhexidina al 2% en eliminar bacterias de los túbulos (Mozayeni, Haeri, Dianat, & Jafari, 2014).

Finalmente, sellantes basados en epoxi y óxido de zinc eugenol tienen actividad antimicrobiana durante sus periodos de asentamiento. En túbulos dentinarios infectados con *E. faecalis*, fueron capaces de eliminar bacterias hasta una profundidad de 300µm (Harrison, Chivatxaranukul, Parashos, & Messer, 2010).

Irrigación ultrasónica pasiva

La irrigación ultrasónica pasiva (IUP) consiste en la activación ultrasónica del irrigante, usualmente NaOCl (Kobayashi, y otros, 2014; van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). El término pasiva se refiere a la acción “no cortante” del instrumento activado con el ultrasonido (van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Al ser no cortante, se reduce al mínimo el riesgo de crear socavados iatrogénicos (van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). La IUP puede hacerse colocando al irrigante con una jeringa en el conducto seguido de la activación ultrasónica o irrigando constantemente a través del mismo ultrasonido (Cameron, 1988, citado en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007; Gu, Kim, Ling, et al., 2009, citados en Paiva s. , y otros, 2013). Ambos métodos son igual de eficaces (van der Sluis, et al., 2006, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

Un dispositivo de ultrasonido convierte la energía eléctrica en ondas ultrasónicas a una cierta frecuencia por magnetostricción o por piezoelectricidad. La magnetostricción es la deformación de un material ferromagnético al someterse a un campo magnético. Por su parte, la piezoelectricidad es la generación de estrés en cristales dieléctricos sometidos a un voltaje. No obstante, no se ha encontrado evidencia concluyente sobre cuál es mejor (van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). En general, la frecuencia a la que oscila el instrumento es entre 25 y 30 kHz (Cki, Kim, Ling, Choi, Pashley & Tay, 2009, citados en Glassman, 2011). Es así, que la energía se transmite en ondas ultrasónicas desde el instrumento oscilante al irrigante en el canal radicular, induciendo a cavitación y transmisión acústica (Metzger, Basrani & Goodis, 2011, citados en Kobayashi, y otros, 2014).

La cavitación acústica se puede definir como la creación de nuevas burbujas o la expansión, contracción y/o distorsión de burbujas preexistentes (llamadas núcleos) en un líquido, como resultado de una energía acústica (Leighton, 1994, citado en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Cuando estas burbujas se expanden y colapsan

rápidamente producen focos de energía, un sonido intenso y daño celular (Brenner, et al., 2002, citado en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Existen dos tipos de cavitación que pueden ocurrir durante la IUP: cavitación estable y cavitación transiente (van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

La cavitación estable se define como una pulsación linear de cuerpos llenos de gas en un campo ultrasónico de baja amplitud. Por su parte, la transiente ocurre cuando burbujas de vapor se someten a pulsaciones de alta energía. Es así que cuando las presiones acústicas son suficientemente altas, las burbujas pueden ser llevadas por inercia a un colapso violento, irradiando ondas y generando altas presiones de gas internas y altas temperaturas (hasta 45°C). La energía al punto de colapso en algunos casos, es suficiente para disociar las moléculas de gas en la burbuja, que se recombinan radioactivamente y producen luz, en un proceso llamado sonoluminescencia (Brenner, et al., 2002, citado en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

No obstante, la cavitación transiente solo ocurre cuando la lima puede vibrar libremente en el canal o cuando apenas lo toca. Es así que la superficie de la lima es importante para aumentar la cavitación. Un instrumento liso con forma transversal cuadrada produce más cavitación que una lima K. Aun así, la cavitación transiente se ve a lo largo del instrumento y en la punta de cualquier instrumento (Roy, et al., 1994, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Sin embargo, la limpieza del canal ocurre en la punta de la lima (Ahmad, Pitt Ford & Crum, 1987, citados en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007). Por otro lado, cuando la lima toca la pared del conducto, la cavitación transiente se ve más afectada que la estable, en especial en el medio de la lima (Roy, et al., 1994, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

Se piensa que la cavitación transiente puede dañar la pared celular y membrana celular por el aumento en temperaturas y presión y por los radicales hidrógeno e hidroxilo generados

(Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al., 1994 citado en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007). No obstante, se ha demostrado que el daño a la membrana se repara rápidamente (Pitt W, McBride M, Lunceford J, Roper R, Sagers, 1994 citado en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007). Esto indica que el ultrasonido solo no es letal para las bacterias planctónicas ni en biofilms (Qian Z, Sagers R, Pitt W, 1999, citado en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007). En consecuencia, se ha propuesto que la cavitación tiene poca importancia práctica en la acción antibacteriana (Ahmad, 1989, citado en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007). Es más, otros autores dicen que la cavitación no tiene mayor beneficio o que ni siquiera ocurre (Walmsley, 1987, Ahmad, et al., 1988, Lumley, et al., 1988, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

Por lo tanto, a pesar que el ultrasonido produce cavitación, esta no es la única explicación de su mayor limpieza de los canales. Puede ser que la debilitación temporal de la membrana bacteriana permita que éstas sean más permeables al irrigante (Joyce E, Phull S, Lorimer J, Mason, 2003, citados en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007). Además, se ha reportado que altos niveles de energía son requeridos para que la cavitación suceda (Ahmad, Pitt Ford & Crum, 1987, citados en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007).

Por otro lado, la transmisión acústica es el movimiento rápido de un fluido en sentido circular como vórtex, alrededor de una lima vibrante (Walmsley, 1987, citado en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Dentro del conducto, se conoce como microtransmisión acústica (Leighton, 1994, citado en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Este movimiento rápido del fluido aumenta la probabilidad de que el irrigante contacte con mayor superficie del canal. Así, se espera la potenciación del mismo (van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

Un patrón de transmisión es un patrón de nodos y antinodos lo largo de la lima oscilante. La amplitud de desplazamiento máxima se da en la punta, causando un flujo con

dirección coronal (Ahmad, et al., 1987, citado en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Es así que, si la lima toca la pared del canal en un antinodo, se causará un mayor desplazamiento de la amplitud que si la toca en un nodo (Lumley, et al., 1993, van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Por lo tanto, cuando un lima no puede vibrar libremente en el canal, la microtransmisión acústica será menos intensa (Roy, et al., 1994, van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Por esta razón, en canales curvos, se recomienda precurvar la lima para impedir su contacto (Ahmad, et al., 1992, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

La frecuencia y la intensidad juegan un rol en la transmisión de la energía al irrigante. En principio, mientras más fina es la lima, más alta es la frecuencia, mayor la amplitud de desplazamiento, mayor la velocidad de transmisión y más poderosa la microtransmisión acústica. En base a esto se podría pensar que una mayor frecuencia debería resultar en un aumento de la transmisión acústica. No obstante, aumentar la intensidad no significa un incremento lineal de la amplitud de oscilación de la lima (Lea, et al., 2004, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Sin embargo, estos estudios se realizaron en aire, por consiguiente no se puede establecer una relación clara con la microtransmisión (van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

Durante la irrigación, el hipoclorito de sodio reacciona con tejido orgánico en el sistema de conductos y resulta en hidrólisis que libera grandes cantidades de amoníaco y dióxido de carbono. Ya que el conducto radicular actúa como un canal cerrado (de Gregorio, Estevez, Cisneros, Heilbom & Cohenca, 2009, citados en Glassman, 2011), esta mezcla gaseosa queda atrapada en la región apical (Cki, Kim, Ling, Choi, Pashley, Tay, 2009, citados en Glassman, 2011) y, rápidamente, forma una columna de gas en el cual no puede penetrar ningún líquido. A este fenómeno se lo conoce como tapón de vapor apical, el cual no se puede remover ni encoger introduciendo instrumentos endodóncicos (Schoeffel, 2008, citado en Glassman,

2011). En consecuencia, la acción del irrigante no llega a los últimos 3mm del conducto (de Gregorio, Estevez, Cisneros, Paranjpe & Cohenca, 2010, citados en Glassman, 2011).

Tanto la cavitación como la microtransmisión acústica son fenómenos solo ocurren en líquidos, no en gases. Por lo tanto, son imposibles en tapón de vapor apical. Esto lleva a pensar que la IUP no es útil para limpiar el tercio apical (Schoeffel, 2008, citado en Glassman, 2011). Es más, solo se ha podido eliminar este tapón con irrigación apical con presión negativa a longitud de trabajo (Nielsen & Baumgartner, 2007, Glassman, 2011). No obstante, se observa acción limpiadora de ultrasonido cuando se irriga solo con agua destilada en apical, comparable a cuando se usa NaOCl (Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011)

Con respecto a su empleo, la IUP se realiza una vez conformado el conducto, con un alambre fino y liso o una lima fina que se introduce en el centro del mismo. Seguido, se llena el canal con irrigante y se activa a la lima. No obstante, el tiempo de irrigación no es claro. Así algunos estudios emplean 15, 20 o 30 segundos (Al-Ali, Sathorn, & Parashos, 2012; Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013; Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011; Menezes, Gadê-Neto, Dametto, de M. Sarmento, & Andrade, 2011) y otros un minuto, un minuto y medio, tres minutos o cinco minutos (Almeida, y otros, 2014; Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Harrison, Chivatxaranukul, Parashos, & Messer, 2010; Kobayashi, y otros, 2014; Paiva S. , y otros, 2012; Paiva s. , y otros, 2013). Igualmente, varios autores dividen el tiempo en ciclos de 20 o 30 segundos (Almeida, y otros, 2014; Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013). Pese a esto, no se encontraron diferencias entre 30 y 60 segundos (Sabins, et al., 2003, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

Una lima y un alambre son igual de efectivos pero hay menos probabilidad de corte con el alambre. (van der Sluis, et al., 2005, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Con respecto a los calibres, se recomiendan un #10 (Menezes, Gadê-Neto, Dametto,

de M. Sarmiento, & Andrade, 2011) o un #15 (Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013; Paiva S. , y otros, 2012; Paiva s. , y otros, 2013).

Por su parte, hay variación sobre a qué profundidad se debe introducir la lima durante su activación. De esta manera, hay quienes recomiendan colocarla a longitud de trabajo (Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013; Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011), 1mm más corta (Paiva S. , y otros, 2012; Paiva s. , y otros, 2013), 2mm más corta (Almeida, y otros, 2014), a 2/3 de la longitud de trabajo (Harrison, Chivatxaranukul, Parashos, & Messer, 2010) y a 6-7mm más corta (Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007).

Con respecto al irrigante, usualmente se emplea hipoclorito de sodio a distintas concentraciones (1%, 2%, 2.5% y 6%) (Al-Ali, Sathorn, & Parashos, 2012; Almeida, y otros, 2014; Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013; Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Harrison, Chivatxaranukul, Parashos, & Messer, 2010; Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011; Paiva S. , y otros, 2012; Paiva s. , y otros, 2013). Esto puede deberse a la forma en la que NaOCl transmite la energía ultrasónica (Leighton, 1994, citado en Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012). Es así que el vapor de clorina parece difundirse dentro de la burbuja durante la expansión de la misma. Esto afecta la dinámica de la burbuja (Brenner, Hilgenfeldt & Lohse, 2002, citados en Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012). No obstante, se puede activar todo tipo de irrigantes con distintos grados de efectividad.

Las pruebas realizadas con irrigación ultrasónica arrojan resultados contradictorios. Es así que varios estudios demuestran su superioridad sobre la irrigación convencional (Al-Ali, Sathorn, & Parashos, 2012; Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Cki, Kim, Ling, Choi, Pashley, Tay, 2009, citados en Glassman, 2011; Harrison, Chivatxaranukul, Parashos, & Messer, 2010), mientras que otros no encuentran mayor beneficio (Bhuva, y otros, 2010; Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011; Menezes, Gadê-Neto, Dametto, de M. Sarmiento, & Andrade, 2011; Paiva S. , y otros, 2012; Paiva s. , y otros, 2013). No obstante, por lo

general, hay consenso en que la irrigación ultrasónica pasiva permite una mayor remoción de tejido en zonas anatómicas complejas (Bhuva, y otros, 2010; Gutarts, Nusstein, Reader & Beck, 2005, citados en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Paiva s. , y otros, 2013; Rodig, Sedghi, Konietschke, Lange, Ziebolz & Hulsmann, 2010, citados en Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011). Por lo que no se observan mayores beneficios en dientes sin dichas complejidades (Paiva s. , y otros, 2013).

Además, si bien muchas veces no es estadísticamente relevante, mejora la capacidad de desinfección del irrigante (Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Harrison, Chivatxaranukul, Parashos, & Messer, 2010; Paiva S. , y otros, 2012; Paiva s. , y otros, 2013) y, según algunos autores, la remoción de barrillo dentinario (Al-Ali, Sathorn, & Parashos, 2012; Huque, et al., 1998, van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Por otro lado, cabe aclarar que la mayoría de los estudios no suelen tomar en cuenta la desinfección tubular, únicamente la del conducto principal (Al-Ali, Sathorn, & Parashos, 2012; Bhuva, y otros, 2010; Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011; Menezes, Gadê-Neto, Dametto, de M. Sarmiento, & Andrade, 2011; Paiva S. , y otros, 2012; Paiva s. , y otros, 2013). Aunque el estudio de Harrison, et al. (2010) encontró que si existe acción a este nivel (70% de desinfección). Sin embargo, cabe aclarar que el estudio se basa en análisis microscópico, que toma en cuenta parte limitadas del conducto. En general, el ultrasonido tiene un efecto limpiador pero necesita principalmente del irrigante (Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011).

Cabe recordar que la irrigación es usualmente de corta duración y que, por lo tanto, su efectividad es limitada en comparación con los medicamentos intraconducto cuyo efecto puede mantenerse por días (Fouad, 2009).

Clorhexidina

El digluconato de clorhexidina es una solución básica fuerte, más estable en forma de sal (Kanisavaran, 2008, citado en Rahimi, y otros, 2014). Su molécula consiste en dos anillos simétricos 4-clorofenil y dos grupos bisguanida conectados por una cadena hexametileno central (Atila-Pektas, Yurdakul, Gulmez & Gorduysus, 2013, citados en Mozayeni, Haeri, Dianat, & Jafari, 2014). Actúa como antiséptico potente, por lo que se la emplea como irrigante final o medicamento intraconducto (Gomes, Montagner, Berber, Zaia, Ferraz, de Almeida & Souza-Filho, 2009, citados en Rahimi, y otros, 2014).

La clorhexidina tiene un componente molecular catiónico que se une a las membranas celulares bacterianas cargadas negativamente (grupos fosfato) y causa su lisis (Atila-Pektas, Yurdakul, Gulmez & Gorduysus, 2007, citados en Mozayeni, Haeri, Dianat, & Jafari, 2014; Siqueira, Pavia & Rôças, 2007, citados en Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009). Esto aumenta la permeabilidad de la pared celular y permite su ingreso (Atila-Pektas, Yurdakul, Gulmez & Gorduysus, 2007, citados en Mozayeni, Haeri, Dianat, & Jafari, 2014; McDonnell & Russell, 1999 citados en Rahman, Chandra, Singh, & Chandra, 2013; Weber, McClanahan, Miller, Diener-West & Johnson, 2003, citados en Raj & Mylswamy, 2011).

A bajas concentraciones, lleva a filtración de iones de bajo peso molecular como iones potasio e iones fosfato (de Souza-Filho, Soares, Vianna, Zaia, Ferraz & Gomes, 2008, citados en Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013). A altas concentraciones, produce la precipitación de los contenidos citoplasmáticos (de Souza-Filho, Soares, Vianna, Zaia, Ferraz & Gomes, 2008, citados en Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013; McDonnell & Russell, 1999, citados en Rahman, Chandra, Singh, & Chandra, 2013). En general, inhibe enzimas y precipita proteínas y ácidos nucleicos (Jones, 2000, citado en Chávez de Paz, Bergenholtz, & Svensater, 2010). También, se une a los lipopolisacáridos y al ácido lipoteicoico del *E. faecalis* y los neutraliza e inactiva. Este efecto inhibitorio aumenta con el

tiempo (Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009). Finalmente, tiene la habilidad de inhibir la matriz metaloproteínasa de la dentina, enzima colagenolítica (Gendron, Grenier, Sorsa & Mayrand, 1999, citados en Marques, y otros, 2014).

Asimismo, posee sustantividad y efecto antimicrobiano prolongado debido a su tendencia a unirse a la hidroxiapatita (Zamany, Safavi & Spangberg, 2003, citados en Rahimi, y otros, 2014). Es más, se ha encontrado que a una concentración de 2% puede tener sustantividad por 15 días (Gomes, Souza, Ferraz, Teixeira, Zaia, Valdrighi, *et al.*, 2003, citados en Dammaschke, Jung, Harks, & Schafer, 2013). También, se pueden calentar soluciones de menor concentración para aumentar su eficacia local, bajando su toxicidad sistémica (Evanov, Liewehr, Buxton & Joyce, 2004, citados en Rahimi, y otros, 2014).

Usualmente, su presentación es en solución o en gel (0.2%, 2% o 5%), aunque también existen puntas de gutapercha con clorhexidina (5%) (Lucena, y otros, 2013). Normalmente, para endodoncia, se recomienda una concentración del 2% en forma de gel como medicación intraconducto por 3, 5, 7 o 14 días (Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012; Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007; Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009; Marques, y otros, 2014; Rahman, Chandra, Singh, & Chandra, 2013; Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013; Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011). Esto se debe a que se considera que la irrigación no proporciona el tiempo de exposición suficiente (Athassiadis, Abbott & Walsh, 2007, citados en Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009).

Por otro lado, se piensa que la baja viscosidad del gel puede impedir el contacto directo del medicamento con los microorganismos (Fernandes, y otros, 2011). También, se ha propuesto su combinación con hidróxido de calcio. No obstante, la combinación ha sido reportada como menos efectiva o igual de efectiva que clorhexidina pura (Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013; Schafer & Bossmann, 2005, citados en Rahimi, y otros, 2014;

Souza-Filho, Soares, Vianna, Zaia, Ferraz & Gomes, 2008, citados en Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012).

Su espectro antimicrobiano es amplio, por lo tanto es efectiva contra aerobios, anaerobios, gram positivos, gram negativos, especies de *Cándida*, esporas, virus lipofílicos y dermatofitos (Athanassiadis, Abbott & Walsh, 2007, citados en Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011; Delany, Patterson, Miller & Newton, 1982, citados en Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012; Gomes, Montagner, Berber, Zaia, Ferraz, de Almeida & Souza-Filho, 2009, citados en Rahimi, y otros, 2014; Greenstein, Berman & Jaffin, 1986, citados en Marques, y otros, 2014; Haapasalo, Endal & Zandi, 2005, citados en Raj & Mylswamy, 2011; Neelakantan, Sanjeev & Subbarao, 2007, citados en Fernandes, y otros, 2011; Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013). Sin embargo, es menos efectiva sobre gram negativos que sobre gram positivos (Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007; Hennessey, 1973, citado en Rahimi, y otros, 2014). Esto puede deberse a que los gram negativos tienen una pared celular más compleja, que los hace menos permeables (Sheldon, 2005, citado en Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009).

La clorhexidina ha probado ser efectiva en remover microorganismos resistentes al hidróxido de calcio como *E. faecalis* y *C. albicans* dentro de túbulos dentinarios (Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012; Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007; Marques, y otros, 2014; Mozayeni, Haeri, Dianat, & Jafari, 2014; Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013; Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011). Es así que varios estudios muestran que el gel de clorhexidina al 2% produce inhibición de *E. faecalis* a una profundidad de 200 y 400 μm desde el primer día y hasta cinco días después de su aplicación (Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013; Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007; Raj & Mylswamy, 2011). Es más, se han encontrado pruebas de sustentividad hasta siete días después de su aplicación (Menezes, y otros, 2004). También, se ha observado que una

irrigación de 10 minutos antes de la obturación resulta en la eliminación completa de *E. faecalis* (Gomes, Souza, Ferraz, et al., 2003, citados en Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007).

No obstante, se ha reportado un aumento en cepas bacterianas resistentes a la clorhexidina (Zhang, et al., 2011, citado en Lucena, y otros, 2013). Igualmente, se ha sugerido que el efecto antimicrobiano de la clorhexidina ha sido sobreestimado por falta de neutralización de las muestras (Kampf, et al., 1998, citado en Lucena, y otros, 2013). Por ejemplo, se encontró que el gel de clorhexidina al 2% produce 78% de cultivos negativos después de una semana de aplicación (Barbosa, Goncalves, Siqueira & De Uzeda, 1997, citados en Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013). También, hay estudios que muestran que la irrigación con clorhexidina al 2% por 30 minutos es menos efectiva que la irrigación con NaOCl al 6% por el mismo tiempo para eliminar *E. faecalis* de los túbulos (Du, y otros, 2014). De forma semejante, otro estudio demostró que la aplicación de clorhexidina sobre *E. faecalis* mantuvo un 60±2% de células vivas (Chávez de Paz, Bergenholtz, & Svensater, 2010).

Otro aspecto importante a tomar en cuenta es que sus efectos pueden ser reducidos por dentina (Portenier, y otros, 2001) y por el tejido necrótico (Machado, Alves, Uzeda, Rocas, & Siqueira, 2010) e inhibidos fuertemente por suero bovino (Machado, Alves, Uzeda, Rocas, & Siqueira, 2010; Portenier, y otros, 2001). Sin embargo, los efectos inhibitorios de la dentina pueden superarse al aumentar la concentración (Haapasalo, Siren, Waltimo, Ørstavik & Haapasalo, 2000, citados en Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007). También, si bien el contenido de proteínas y bioproductos de la degeneración tisular en la necrosis afecta su actividad antimicrobiana, parece que estos efectos son dependientes del tiempo (Machado, Alves, Uzeda, Rocas, & Siqueira, 2010). Por otro lado, a pesar de que su alta sensibilidad al suero puede ser un problema en caso de exudado inflamatorio periapical en el conducto, su

inhibición es menor que la experimentada por el hidróxido de calcio (Portenier, y otros, 2001).

Como irrigante endodóncico, la clorhexidina interactúa con el NaOCl y forma un precipitado marrón que puede interferir con el sellado e inducir cambio de color en el diente (Mohammadi & Abbott 2009, citado en Lucena, y otros, 2013; Basrani, Manek, Sodhi, Fillery & Manzur, 2007, citados en Marques, y otros, 2014). Este precipitado contiene paracloroanilina (PCA), tóxico y carcinogénico en ratas (Basrani, Manek, Mathers, Fillery & Sodhi, 2010, citados en Paiva S. , y otros, 2012). Por esta razón, se recomienda usar EDTA previo a clorhexidina para neutralizar al NaOCl (Zehnder, 2006, citado en Lucena, y otros, 2013). También, ha resultado útil la irrigación con tiosulfato de sodio (Paiva S. , y otros, 2012). Por otro lado, se ha criticado su incapacidad de disolver tejido necrótico (Evanov, Liewehr, Buxton & Joyce, 2004, citados en Rahimi, y otros, 2014) y que su efecto antimicrobiano es dependiente del pH, siendo más efectivo en ambientes con pH neutro (Kanisavaran, 2009, citado en Dammaschke, Jung, Harks, & Schafer, 2013).

De forma semejante, se ha encontrado que no actúa como barrera física contra la recolonización microbiana (Buck, Cai, Eleazer, Staat & Hurst, 2001, citados en Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013). Además, su acción no es uniforme en todo el biofilm. Así, las células en la superficie son más afectadas (Chávez de Paz, Bergenholtz, & Svensater, 2010). Igualmente, puede mostrar efectos secundarios de citotoxicidad en células corneas y endoteliales, al igual que neurotoxicidad (Henschen & Olson, 1984, citados en Lucena, y otros, 2013) y, a una concentración de 2%, es irritante para la piel (Foulkes, 1973, citado en Rahimi, y otros, 2014).

No obstante, a pesar de todas estas limitaciones, se puede afirmar que la clorhexidina es soluble, fácil de remover y no interfiere con el sellado de cementos obturadores (Vivacqua-Gomes, Ferraz, Gomes, Zaia, Teixeira & Souza-Filho, 2003, citados en Marques, y otros,

2014). Además, solo es ligeramente tóxica y los efectos secundarios son raros (Basrani, Tjäderhane, Santos, Pascon, Grad, Lawrence, *et al.*, 2003, citados en Dammaschke, Jung, Harks, & Schafer, 2013).

Medicamentos intraconducto

Si bien las técnicas químico-mecánicas reducen significativamente el número de bacterias intraconducto, ninguna de éstas asegura una dentina estéril (Siqueira, Magalhães, & Rôças, 2007). Esto se debe a que la instrumentación tiende a producir preparaciones redondas, no acorde con la anatomía del conducto. Así, un 50% del conducto queda sin instrumentar, por lo que los restos proveen de nutrientes a las bacterias remanentes (Love, 2001, citado en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). Igualmente, las bacterias se alojan en los túbulos dentinarios y dificultan la acción de desinfectantes que requieren de contacto para su acción (Wu, Dummer & Wesselink, 2006, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

Es así que entre 40 y 60% de los conductos presentan cultivos positivos tras tratamiento convencional (McGurkin-Smith, Trope, Caplan, Sigurdsson, 2005, citados en Siqueira, Magalhães, & Rôças, 2007). Por esta razón, entre 10 y 20% de infecciones primarias y entre 20 y 50% de retratamientos no sanan cuando se realizan únicamente conformación e irrigación (Sjögren, *et al.*, 1990, citados en Portenier, y otros, 2001). Es así que, si bien se puede tener éxito en un tratamiento con presencia de microorganismos, su ausencia ciertamente beneficia a la resolución. Por esta razón, la colocación de medicación intraconducto favorece al tratamiento de infecciones endodóncicas (Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007; Siqueira, Magalhães, & Rôças, 2007; Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007), especialmente, aquellas resistentes al tratamiento convencional (Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

Un medicamento intraconducto posee ciertas funciones. Entre ellas se encuentran la inducción de la sanación de tejido duro, la neutralización de los restos de tejido (Fouad, 2009), la reducción de la inflamación periapical, la eliminación del exudado periapical, el prevenir o detener la reabsorción radicular inflamatoria y el prevenir la reinfección del sistema de conductos. Esta última requiere que el medicamento actúe como una barrera física y química en caso de que la restauración provisional se pierda (Athanasias, Abbott, & Walsh, 2007).

No obstante, la función principal es la eliminación de las bacterias remanentes tras la instrumentación e irrigación (Athanasias, Abbott, & Walsh, 2007; Fouad, 2009). Por lo tanto, es necesaria una sustancia que sea capaz de erradicar bacterias remanentes y que sea capaz de penetrar profundo en los túbulos, llegando incluso a áreas asociadas con reabsorción externa del cemento (Fouad, 2009).

También, se ha propuesto que 14 días es el tiempo mínimo para dejar una medicación intraconducto. Esto se debe a que a la inflamación le toma al menos de 10 a 14 días para desistir o sanar (Abbott, 1990, citado en Athanasias, Abbott, & Walsh, 2007). Es más, periodos más largos se consideran más deseables ya que a la mayoría de medicamentos necesitan de tres a cuatro semanas para alcanzar un máximo de concentración en la dentina periapical (Nerwich, Figdor & Messer, 1993, citados en Athanasias, Abbott, & Walsh, 2007). Si los signos y síntomas no ceden, entonces un tiempo aún más largo es requerido (Athanasias, Abbott, & Walsh, 2007).

Cabe aclarar que en casos de infecciones primarias agudas con producción de pus, el uso de antibióticos sistémicos está recomendado. De esta forma, se intenta prevenir la propagación de la infección. Entre los antibióticos de elección se encuentran la amoxicilina y la penicilina por la naturaleza de la infección polimicrobiana y anaerobia (Fouad, 2009).

Hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio es el medicamento endodóncico más usado (Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011). Consiste en un polvo blanco inodoro (Rahimi, y otros, 2014) con baja solubilidad en agua, insoluble en alcohol y con pH entre 12.5 y 12.8. Su baja solubilidad en agua es una característica deseable ya que se requiere de un periodo prolongado para que se reabsorba (Fava, Saunders, 1999, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). Esta sustancia elimina a las bacterias por contacto directo gracias a su alto pH (Gomes, Ferraz, Vianna, et al., 2002, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). Así, la liberación y difusión de iones hidroxilo (OH) produce un ambiente altamente alcalino no apropiado para la supervivencia de microorganismos (Tang, Samaranayake & Yip, 2004, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). En consecuencia, la disponibilidad de iones en el sitio de acción es necesaria para la acción terapéutica (Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

La disponibilidad de los iones depende del vehículo que se emplea (Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007; Robert, Liewehr, Buxton & Pherson, 2005, citados en Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011). Por ejemplo, el hidróxido de calcio con glicerina es más efectivo que con agua destilada (Sudeep, Antony, Kamath, Bhat, 1997, citados en Ganesh, y otros, 2014). Igualmente, cuando se lo ha mezclado con paramoclofenol alcaforado, su potencial antimicrobiano se ha potenciado (Siqueira, Magalhães, & Rôças, 2007; Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007; Gangwar, 2011). No obstante, es considerado tóxico por ser un compuesto aromático (Magalhães, y otros, 2011; Dammaschke, Jung, Harks, & Schafer, 2013). También, se lo ha empleado con propilenglicol, resultando efectivo contra *E. faecalis* (Magalhães, y otros, 2011; Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011) y con yodoformo, efectivo contra *C. albicans*. En

ambos casos con inhibición uniforme a profundidades de 200 y 400 μ m (Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011).

Por otro lado, se ha observado que los iones hidroxilo se difunden más rápido a través de la dentina en el tercio cervical. Toma horas para que estos lleguen a dentina interna (adyacente al conducto) y entre uno y siete días para que alcancen a la externa (cercana al cemento). Tras tres o cuatro semanas se obtiene el pH máximo y se estabiliza. No obstante, a los siete días, hay un pH de 9, al cual varias bacterias no crecen (Nerwich, Figdor & Messer, 1995, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). De forma semejante, otro estudio muestra que las concentraciones de iones tienen un pico y se estabilizan entre 2 y 3 semanas (Gomes, Chevitere, De Almeida, Salles & Gomes, 1996, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). Sin embargo, el estudio de Esberard, et al, (1996) indica un incremento de pH hasta 9 en los primeros tres días, un descenso en los siguientes 18 días y un alza y permanencia de un pH de 10 por los siguientes 120 días (citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). De esto se puede concluir que se requiere de un tiempo mínimo de aplicación de 7 días (Sjogren, Figdor, Spangberg & Sundqvist, 1991, citados en Rahimi, y otros, 2014; Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011).

Cabe recalcar que cuando el hidróxido de calcio entra en contacto con dióxido de carbono o iones carbonato (metabolismo bacteriano), se forma carbonato de calcio. Este compuesto tiene solubilidad muy baja y crea un pH de 8, sin propiedades biológicas ni antibacterianas. De esta forma, el 10% de hidróxido de calcio se transforma en carbonato de calcio en la región apical en los primeros dos días aunque hay poco presente en tercio medio aún tras seis semanas (Kwon, Fujishima & Imai, 2004, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

Los efectos antimicrobianos del hidróxido de calcio se deben a varios mecanismos químicos y físicos. Los químicos son daño a la membrana citoplasmática por acción directa

de los iones hidroxilo, supresión de la actividad enzimática con disrupción del metabolismo celular e inhibición de la replicación de ADN (por fragmentación). Los físicos, por su lado, se deben a que actúa como una barrera física que llena el espacio dentro del canal, previniendo el ingreso de bacterias, restringiendo los sustratos y limitando el espacio para su multiplicación (Siqueira & Lopes, 1999, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

Entre sus propiedades biológicas se encuentra su biocompatibilidad por su baja solubilidad en agua y difusión limitada. También, tiene la habilidad de inducir la sanación de tejido calcificado periapical, inhibir la reabsorción y estimular a la sanación periapical tras un trauma. Esto gracias a que el ambiente alcalino interfiere con la actividad de reabsorción de los dentinoclastos que requieren de un ambiente ácido para disolver los minerales. Igualmente, inactiva lipopolisacáridos (LPS) (Lin, Mickel & Chogle, 2003, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

No obstante, posee efectividad limitada de desinfección de túbulos dentinarios. Esto se debe a la capacidad amortiguadora de la dentina, además de la baja solubilidad y difusión de la sustancia en sí, lo que dificulta conseguir el pH necesario. Igualmente, existe un potencial alcalino variable entre las distintas formulaciones de hidróxido de calcio. Por otro lado, los biofilms densos ubicados sobre los túbulos y el tejido necrótico en irregularidades anatómicas pueden proteger a las bacterias. Además, el mismo hidróxido de calcio promueve la adhesión de las bacterias al colágeno. También, existen especies como el *E. faecalis* que tienen la habilidad de colonizar los túbulos y evadir los iones hidroxilo (Siqueira & Lopes, 1999, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

Se ha sugerido que el uso de hidróxido de calcio es un factor contribuyente a la presencia continua de *E. faecalis* tras el tratamiento endodóncico. Esto se debe a que el efecto del hidróxido de calcio sobre *E. faecalis* es completamente abolido por la presencia de dentina (Schafer & Bossmann, 2005, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). Es más, se ha

encontrado que pierde toda su actividad antimicrobiana tras 24 horas en presencia de dentina, hidroxiapatita y albumina de suero bovino (Portenier, y otros, 2001). Sin embargo, se ha observado que el hidróxido de calcio puede eliminar *E. faecalis* cuando está presente en bajas cantidades (infección primaria). Aunque resulta infectivo cuando está en mayores números (infección secundaria) (Sundqvist, Figdor, Persson & Sjögren, 1998, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). Por ello, su uso en retratamiento de dientes infectados con periodontitis apical ha sido cuestionado (Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

En general, el uso de hidróxido de calcio produce una reducción en la mayoría de especies intraconducto (De Souza, Teles, Souto, Chaves & Colombo, 2005, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). No obstante, 27% de pacientes tratados presentan cultivos positivos en infección primaria (Law & Messer, 2004). Así, se puede observar un aumento modesto en *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens* y *E. nodatum* (De Souza, Teles, Souto, Chaves & Colombo, 2005, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007) y permanencia de *Streptococo sanguinis* (Mohammadi, Giardino & Mombeinipour, 2012, citados en Mozayeni, Haeri, Dianat, & Jafari, 2014). También, se ha demostrado que las especies de *Cándida* son aún más resistentes a hidróxido de calcio saturado que el *E. faecalis*. Por lo tanto, el hidróxido de calcio no pueden considerarse un medicamento intracanal universal para todos los casos de raíces infectadas periodontitis apical (Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011).

Finalmente, las últimas desventajas tienen que ver con la dificultad que presenta para su remoción y el hecho que disminuye el tiempo de asentamiento de cementos de óxido de zinc (Almyroudia, Mackenzie, McHugh & Saunders, 2002, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

Aceite ozonizado

El ozono (O₃), es una molécula triatómica, altamente inestable que se descompone en oxígeno puro. Este oxígeno monoatómico liberado es altamente oxidativo (Restaino, Frampton, Hemphill & Palnikar, 1995, citados en Kishen, 2012), haciendo del ozono la tercera molécula más oxidante conocida (Dhingra, Kumar, & Raghavan, 2014). En la cavidad oral, se usa en forma de agua, aceite de oliva o gas (Dhingra, Kumar, & Raghavan, 2014; Seidler, Linetskiy, Hubalkova, Stankova, Smucler & Mazanek, 2008, citados en Rahimi, y otros, 2014; Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007). El agua y el aceite son medios ideales para contener al ozono y después liberarlo. Estas formas se pueden emplear de forma individual o combinándolas (Seidler, Linetskiy, Hubalkova, Stankova, Smucler & Mazanek, 2008, citados en Rahimi, y otros, 2014). En la práctica endodóncica, el ozono se ha empleado, usualmente, en forma de gas (Mohammadi, Shalavi, Soltani & Asgary, 2013, citados en Rahimi, y otros, 2014).

En forma de gas no puede almacenarse ya que tiene una vida media de 40 minutos a 20°C (Dhingra, Kumar, & Raghavan, 2014). A pesar de ello, se ha observado que tiene un potencial de oxidación muy alto y es 1.5 veces más efectivo que la clorina contra bacterias, virus, hongos y protozoarios. También, aumenta la circulación sanguínea y la respuesta inmune (Mohammadi, Shalavi, Soltani & Asgary, 2013, citados en Rahimi, y otros, 2014). Semejante, la forma de aceite posee fuerte actividad antimicrobiana, efectos de desbridamiento y puede estimular la angiogénesis. Es bactericida, virudicida y esporicida (Rilling, 1983, citado en Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007). Así, la hidrólisis del aceite ozonizado puede generar peróxido de hidrógeno, aldehídos y cetonas (Zappi, 1952, citado en Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007).

El peróxido de hidrógeno actúa como un oxidante que ataca los componentes celulares esenciales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En consecuencia, puede inducir a una

disrupción de la membrana citoplasmática, oxidación de las enzimas y daño del ADN. Esto explica la excelente eficacia del aceite ozonizado en bacterias anaerobias. Por su parte, los aldehídos tienen actividad antibacterial fuerte al inducir la formación de proteínas con enlaces cruzados y subsecuente inhibición de varias enzimas del metabolismo bacteriano. También, alquilan grupos carboxilo, sulfhidrilo e hidroxilo, presentes en los ácidos nucleicos y/o proteínas (Shapiro, 1996, citado en Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007). Finalmente, los lípidos insaturados presentes en el aceite se incorporan a la membrana citoplasmática, induciendo perturbaciones letales en su estructura, disrupciones en su integridad y liberación de los constituyentes intracelulares (Siqueira JF Jr, Rôças IN, Cardoso CC, Macedo SB, Lopes, 2000, citados en Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007). Esta acción es específica para células microbianas y efectiva ante cepas resistentes a antibióticos (Dhingra, Kumar, & Raghavan, 2014). Además, presenta un pH menor a 2 (Vinueza, 2010), en el cual microorganismos resistentes como el *E. faecalis*, no pueden sobrevivir (Evans, Davies, Sundqvist & Figdor, 2002, citados en Sponchiado, Pereira, Marques, da Fonseca, & França, 2014).

También, es inmunoestimulante ya que activa los sistemas celulares y humorales, estimula a la proliferación de células inmunes, induce a la síntesis de inmunoglobulinas y promueve la activación de antioxidantes biológicos. Es analgésico, antihipóxico y desintoxicante (por activación del proceso aerobio). Igualmente, es bioenergético e impulsa a la biosíntesis ya que activa la formación de proteínas y mejora el metabolismo celular (a nivel del ribosoma y mitocondria). De forma semejante, promueve la síntesis de sustancias biológicamente activas como interleucinas, leucotrienos y prostaglandinas (Dhingra, Kumar, & Raghavan, 2014).

Se ha encontrado que el ozono, a relativamente bajas concentraciones, puede eliminar efectivamente al *Escherichia coli* y células vegetativas y esporas de *Bacillus cereus* y *Bacillus*

megaterium (Broadwater, Hoehn & King, 1973 citados en Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007). También, se ha evaluado con bacterias comúnmente asociadas a enfermedad periapical, probando ser más efectivo que el hidróxido de calcio (Siqueira, Rôças, Cardoso, Macedo & Lopes, 2000, citados en Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007).

En la investigación de Viera, et al. (2007) empleando un modelo animal *in vivo*, se estudió sus efectos en forma de aceite (99%) como medicamento intraconducto frente al *E. faecalis* y se observó que posee un éxito mayor que el hidróxido de calcio con paramoclorofenol alcaforado en resolver lesiones periapicales. Esto muestra altos niveles de desinfección puesto a que el paramonoclofenol alcaforado posee alta eficacia frente a este microorganismo (Siqueira, Magalhães, & Rôças, 2007; Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007; Gangwar, 2011). No obstante, como ya se ha mencionado antes, por ser un compuesto aromático, es tóxico (Chang, Tai, Chou & Chou, 1999, citados en Magalhães, y otros, 2011).

También, se ha encontrado que agua ozonizada es altamente efectiva para acabar con microorganismos gram positivos y gram negativos (Nagayoshi, Fukuizumi, Kitamura, Yano, Terashita & Nishihara, 2004, citados en Rahimi, y otros, 2014). Bacterias gram negativas, como *Porfirimonas endodontalis* y *Porfiromonas gingivalis* fueron más sensibles que estreptococos gram positivos y *C. albicans* (Siren, Haapasalo, Waltimo & Orstavik, 2004, citados en Rahimi, y otros, 2014). No obstante, la capacidad antimicrobiana del ozono probó ser menor que la del hipoclorito de sodio (Kustarci, Sumer, Altunbas & Kosum, 2009, citados en Rahimi, y otros, 2014). Sin embargo, la incorporación de ozono gaseoso en NaOCl al 0.5% potencia sus efectos de disolución de tejido orgánico (Rossi-Fedele, y otros, 2013).

En base a esto cabe aclarar que los resultados de la eficacia de ozono contra patógenos endodóncicos han sido inconsistentes. Esto se debe a que hay una falta de información sobre

la duración óptima de aplicación y concentración que se debe usar. En general, se considera que una concentración de 4g/m^3 en forma de gas es relativamente no tóxica para el tejido periapical y la mucosa oral. Así, se considera ligeramente menos tóxica que el NaOCl al 2.5% (Mohammadi, Shalavi, Soltani & Asgary, 2013, citados en Mohammadi, Karim, & Shalavi, 2014).

Por su parte, el ozono acuoso con una concentración de 20mg/mL ha mostrado no tener toxicidad en células orales *in vitro* (Mohammadi, Shalavi, Soltani & Asgary, 2013, citados en Mohammadi, Karim, & Shalavi, 2014). Por otro lado, se ha mostrado que tiene un efecto antibacteriano en células planctónicas de *E. faecalis* pero poco efecto en biofilm (Hems, Gulabivala, Ng, Ready & Spratt, 2005, citados en Mohammadi, Karim, & Shalavi, 2014). También, se ha encontrado que su efecto antimicrobiano no es comparable con el del NaOCl y que el incremento en el tiempo de contacto no aumenta la eficacia contra biofilm (Viera, Guiamet, De Mele & Videla, 1999, citados en Mohammadi, Karim, & Shalavi, 2014). No obstante, el ozono acuoso mejora su acción antimicrobiana contra *E. faecalis* con ultrasonido, cuando se emplea como irrigante por 120 segundos y se activa por 30 segundos (Case, Bird, Kahler, George, & Walsh, 2012). Así, se puede decir que el ozono transportado en fluidos puede ser un adyuvante útil para la desinfección endodóncica (Case, Bird, Kahler, George & Walsh, 2012, citados en Rahimi, y otros, 2014).

El ozono mejora la sanación de heridas, el tratamiento de caries superficiales y puede emplearse contra la microbiota endodóncica. Aún más, no tiene un efecto adverso significativo en la adhesión a dentina (Rahimi, y otros, 2014). Es así que la aplicación de ozono gaseoso no afecta a la adhesión de postes de fibra de vidrio, aunque se observó una disminución de fuerza de adhesión cuando se emplea Rely X Unicem (Bitter, Noetzel, Volk, Neumann, & Kielbassa, 2008). A pesar de estas ventajas, cabe tomar en cuenta que la inhalación de ozono puede ser tóxica para el sistema pulmonar y otros órganos. También,

debido a su alto poder oxidativo, todas las sustancias que entran en contacto deben ser resistentes como vidrio, silicón o teflón (Rahimi, y otros, 2014).

Cámara de bioseguridad tipo A2

Las cámaras de bioseguridad son los principales medios de contención desarrollados para trabajar de forma segura con microorganismos infecciosos. Esto se debe a que mantienen la esterilidad del ambiente e impiden la contaminación cruzada. La mayoría emplean filtros de aire particulado de alta eficiencia. En general, estos filtros son una sola hoja de fibras de borosilicato plegada y tratada con un aglutinante resistente a la humedad y repelente de agua. Así, remueven el tamaño de partículas más penetrantes ($0.3 \mu\text{m}$) con eficacia de un 99.97%. En consecuencia, esporas, virus y bacterias son retirados del aire (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

El flujo del aire particulado de alta eficiencia sigue el principio del flujo laminar. Esto quiere decir que el aire se mueve en sentido unidireccional a una velocidad fija a lo largo de líneas paralelas, reduciendo así la turbulencia y permitiendo un comportamiento predecible de las partículas. De esta manera, se crea una cortina de aire contenida en la cámara. Este principio permite proteger al operador de infecciones por aerosol. No obstante, el meter y sacar objetos de la cámara o hacer movimientos rápidos con los brazos pueden extraer algunas de esas partículas de contaminantes al medio externo (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

Las cámaras de bioseguridad tipo 2 no son efectivas capturando químicos volátiles o gases. Sin embargo, están indicadas para trabajar con microorganismos con niveles de bioseguridad 1, 2, 3 y 4. Por su parte, la cámara de bioseguridad tipo A2 posee una velocidad de flujo de 100 pies por minuto. Además, permite emplear cantidades mínimas de químicos volátiles tóxicos (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

Figura 5. Cámara de bioseguridad tipo A2



Biobase. (2 de marzo de 2015). *A2 Biological Safety Cabinet*. Obtenido de Biobase:
<http://www.biobase.cc/productdetail.asp?Pid=178>

3. Metodología

El siguiente será un estudio experimental comparativo y analítico *in vitro*

Muestra

Cincuenta incisivos bovinos

Criterios de inclusión: incisivos de conducto único y recto (curvatura menor que 30 grados) permeable con ápice cerrado, recientemente obtenidos de mandíbulas de animales sacrificados por fines comerciales, sin fisuras, sin fracturas, sin reabsorción externa o interna, sin caries, sin lesión periapical y con amplitud de conducto inicial menor a una lima #60 K.

Criterios de exclusión: fisuras, fracturas, conductos curvos, conductos calcificados, reabsorción externa o interna, necrosis pulpar, lesión periapical, formación radicular incompleta o amplitud de conducto inicial mayor a una lima #60.

Materiales

Muestras

- Cincuenta incisivos de bovino
- *E. faecalis* (ATCC 29212)

Reactivos

- Ácido ortofosfórico al 35% marca Novo
- Adhesivo de resina marca Novo
- Resina Fluida marca Novo
- Clorhexidina líquida al 2% marca Lira
- Hidróxido de calcio en polvo marca Proquident
- Aceite ozonizado al 95% marca Gelozone
- Hipoclorito de sodio al 5.25% marca Supermaxi

- EDTA al 17% marca Eufar
- Tiosulfato de sodio al 5% obtenido de Laboratorios HVO
- Tween 80 marca Difco al 3% con lecitina al 0.3% marca Natural Wealth
- Agua destilada
- Reactivos de tinción Gram marca BD
- Peróxido de hidrógeno al 3% marca Merk
- Bilis esculina marca BD

Medios de almacenamiento y cultivo

- Solución salina marca Lamosan
- Agar de soya tripticasa marca BD
- Caldo de soya tripticasa marca BD
- Chromocult enterococci broth marca Merck
- Peptona de caseína marca BD

Instrumental

- Elevador recto
- Forceps inferior
- Curetas periodontales marca American Eagle
- Pinzas de algodón
- Pinzas Miller
- Limas 10-15K marca Dentsply Maillefer
- Limas Flexofile de primera y segunda serie marca Dentsply Maillefer
- Limas Hedström primera serie marca Dentsply Maillefer
- Gates Glidden marca Dentsply Maillefer
- Calibrador de limas marca Dentsply Maillefer
- Disco de diamante marca BesQual

- Espátula metálica
- Espátula plástica
- Gutaperchero metálico

Materiales

- Guantes
- Mascarilla facial
- Microbrush
- Esmalte de uñas
- Hisopos
- Palillos
- Cera pegajosa
- Bolitas de algodón estériles
- Conos de papel estériles marca VDW y Alfred Betch GMBH
- Gasa estéril
- Jeringas de 5mL
- Agujas de irrigación marca Henry Schein y Ultradent
- Loleta

Implementos de laboratorio

- Frascos de vidrio autoclavables
- Tubos de ensayo
- Platos petri
- Pipeta de 10mL
- Micropipeta de 1mL
- Asa
- Frasco GasPak

Equipos

- Micromotor NSK
- Lámpara LED marca Woodpecker
- Refrigerador
- Microondas
- Autoclave marca Market Forge
- Centrífuga marca Gemmy Industrial Corp
- Incubadora marca Pol-Eko Aparatura
- Ultrasonido marca Woodpecker
- Vórtex marca Sensaur
- Mechero
- Balanza de laboratorio marca Boeco
- Cámara de bioseguridad tipo A2 marca Biobase

Metodología

Recolección de las muestras

Los dientes fueron obtenidos en un periodo de una semana de animales sacrificados por fines comerciales. Como primer paso, se procedió a la extracción de los dientes de las mandíbulas; seguido, se realizó la eliminación de restos de hueso y ligamento periodontal sumergiendo las muestras en hipoclorito de sodio al 5.25% por una hora. A continuación, se eliminaron los restos de ligamento periodontal raspando suavemente con curetas y enjuagando con hipoclorito de sodio al 5.25% y se los almacenó en solución salina a 5°C por 24 horas.

Figura 6. Limpieza de las muestras

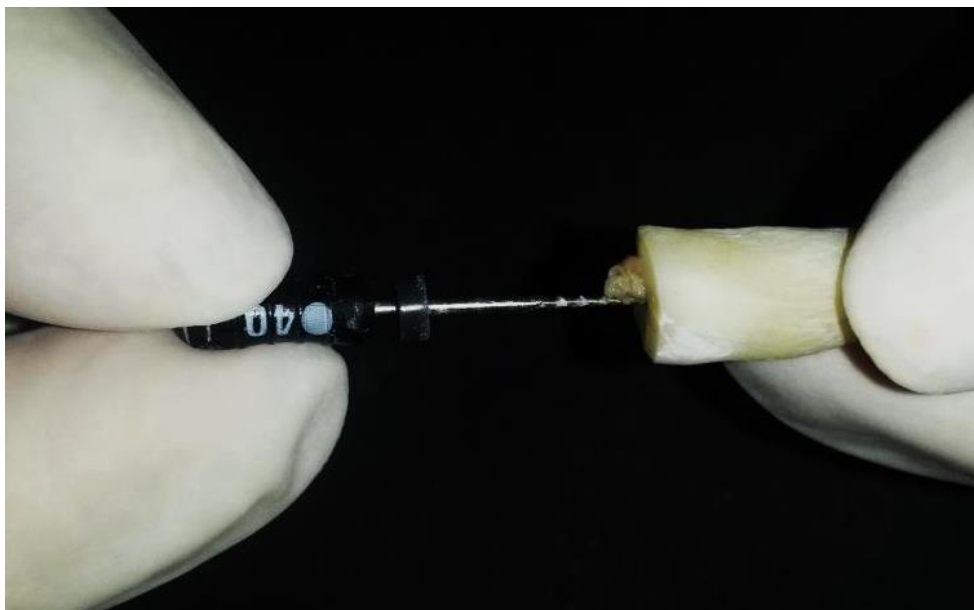


Preparación inicial y mecánica- química de las muestras

Se realizó corte del diente hasta dejar una longitud de conducto aproximada de 15mm empleando micromotor con disco de diamante. Seguido, se eliminó la pulpa empleando limas Hedström, se confirmó la longitud de trabajo empleando limas 15K y se almacenó en solución salina a 5°C.

Figura 7. Muestra cortada



Figura 8. Extracción de la pulpa

Se procedió a realizar instrumentación ápico-coronal con limas Flexofile manteniendo como lima apical maestra a la lima #80 y ampliando hasta Gates Glidden #6 en los tercios medio y cervical. El protocolo de irrigación consistió en 1mL entre lima y lima de suero fisiológico; tras la instrumentación mecánica, 5mL de NaOCl al 5.25%, 1mL de EDTA al 17% por un minuto, 1mL de solución salina, 5mL de NaOCl al 5.25% por tres minutos y 1mL de suero fisiológico. Se secó el interior de los conductos con conos de papel estériles y el exterior de la raíz con gasa estéril. Seguido, se colocó ácido ortofosfórico alrededor de foramen por 10 segundos, se enjuagó y se secó ligeramente. A continuación, se colocó adhesivo, se dejó actuar por 30 segundos y se fotopolimerizó por 20 segundos. Finalmente, se colocó resina fluida en el foramen y se fotopolimerizó por 20 segundos a fin de sellarlo.

Figura 9. Foramen sellado con resina



Grupos experimentales

Las muestras se dividieron en cinco grupos con diez dientes: ocho fueron expuestos al medicamento o irrigante, uno fue el control positivo, infectado sin medicamento o irrigante, y otro fue el control negativo, sin infección ni medicamento o irrigante. A continuación, se cubrió el cemento dental con esmalte de uñas para sellarlo y minimizar el crecimiento bacteriano en esta superficie. Las muestras se almacenaron en suero fisiológico a 5°C.

Figura 10. Colocación de esmalte de uñas



Tabla 1. Grupos experimentales

Grupo	Muestras (8 dientes)	Control positivo (1 diente)	Control negativo (1 diente)
Grupo hidróxido de calcio	Exposición a hidróxido de calcio por 15 días	Infección por 36 días, sin medicamento	Sin infección y sin medicamento por 36 días
Grupo aceite ozonizado	Exposición a aceite ozonizado por 8 días	Infección por 28 días, sin medicamento	Sin infección y sin medicamento por 28 días
Grupo clorhexidina	Irrigación con 10 mL de clorhexidina	Infección por 21 días, sin irrigación	Sin infección y sin irrigación por 21 días
Grupo IUP	Irrigación con 10 mL de NaOCl y activación ultrasónica por 30 segundos	Infección por 21 días, sin irrigación	Sin infección y sin irrigación por 21 días
Grupo irrigación convencional	Irrigación con 10 mL de NaOCl	Infección por 21 días, sin irrigación	Sin infección y sin irrigación por 21 días

Preparación de los medios de cultivo

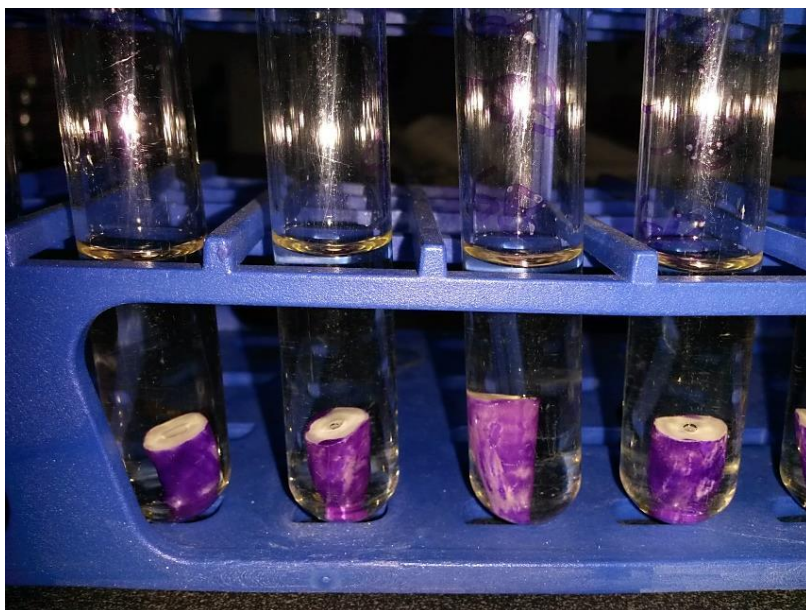
Se preparó el caldo de soya tripticaasa empleando las instrucciones del fabricante (concentración de 30g por litro) disolviendo el polvo en agua destilada, agitando hasta obtener una mezcla homogénea y calentando en microondas (1 minuto por cada 100mL), de ser necesario para homogenizar aún más. Seguido, se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°.

Con respecto al agar de soya tripticaasa, se agregó agar a una mezcla de caldo de soya tripticaasa hasta una proporción de 1.5%, se calentó en microondas (1 minuto por cada 100mL) para homogenizar la mezcla y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°. A continuación, manteniendo al agar líquido a unos 45-50 °C, se vertió sobre platos Petri y se dejó enfriar por 5 horas cubierto con un mantel de tela.

Esterilización de las muestras

Se secaron las muestras con gasa y los conductos con conos de papel estériles. Cada muestra fue colocada en un tubo de ensayo con 5mL de caldo de soya tripticasa, se esterilizó por 15 minutos a 121°.

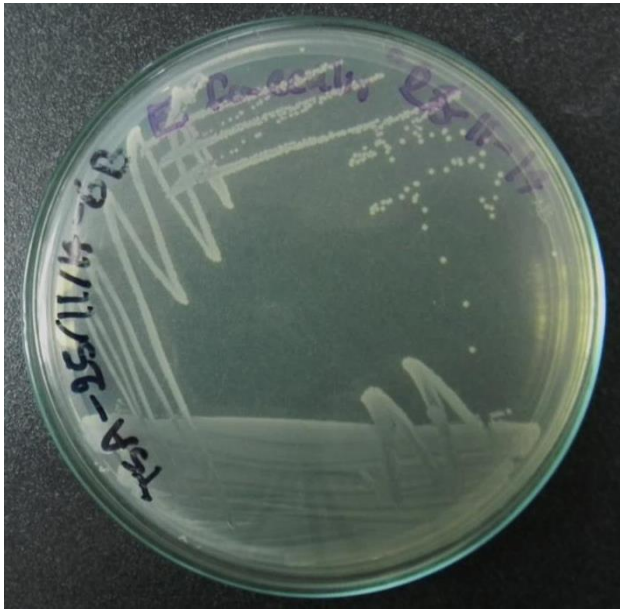
Figura 11. Esterilización de muestras



Preparación de inóculos de *E. faecalis*

La suspensión microbiana que sirvió como inóculo se preparó de *E. faecalis* (ATCC 29212). Se cultivó aeróbicamente por 18-24 horas a 35°C en agar de soya tripticasa. Tras, el periodo de incubación, las colonias fueron llevadas a caldo de soya tripticasa empleando hisopo estéril y se ajustaron a la turbiedad estándar de 0.5 McFarland BaSO₄ (1.5×10^8 microorganismos). Los inóculos fueron empleados dentro de los primeros 30 minutos de preparación.

Figura 12. Agar con *E. faecalis*



Infección de las muestras

Las muestras se contaminaron introduciéndolas en 5mL de caldo de soya tripticaa contaminado con *E. faecalis* que se selló, se centrifugó por 2 minutos a 3500 RPM y se cultivó por 21 días a 35°C. Para prevenir la desecación bacteriana se colocó inóculo nuevo cada 2 días.

Figura 13. Muestras infectadas



Preparación de los medicamentos y soluciones neutralizantes

Pasta de hidróxido: se obtuvo al mezclar el polvo con suero fisiológico en proporción 1:1 empleando espátula y loseta estériles.

Aceite ozonizado (95% O₃): se obtuvo preparado en su versión comercial.

Clorhexidina al 2%: se obtuvo preparada en su versión comercial.

Hipoclorito de sodio al 5.25%: se obtuvo preparado en su versión comercial.

Tween 80 al 3% con lecitina al 0.3%: se obtuvo disolviendo en agua destilada y filtrando con membrana de 0.45µm.

Tiosulfato de sodio al 5%: se obtuvo disolviendo en agua destilada.

Colocación del medicamento/irrigante

Una vez finalizado el periodo, se extrajeron las muestras de los tubos de ensayo. Éstas se secaron con gasa estéril y los conductos con conos de papel estériles. La entrada al conducto se cubrió con cera pegajosa. Para eliminar las bacterias presentes en la superficie exterior, recubierta por esmalte, se colocó a las muestras por una hora en hipoclorito de sodio al 5.25%, cambiando de irrigante cada 30 minutos. Este procedimiento se realizó cerca de mechero para mantener la esterilidad del ambiente. A continuación, los especímenes se llevaron a luz UV por 30 minutos, en la cámara de bioseguridad tipo A2.

Figura 14. Muestras sumergidas en NaOCl

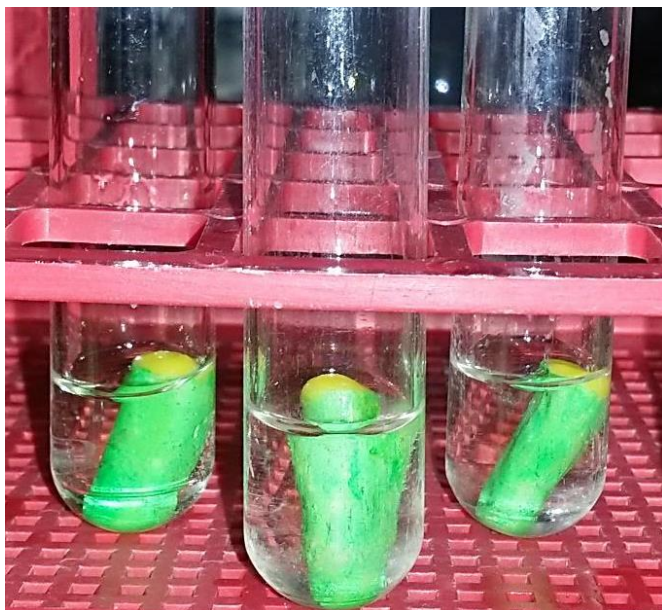
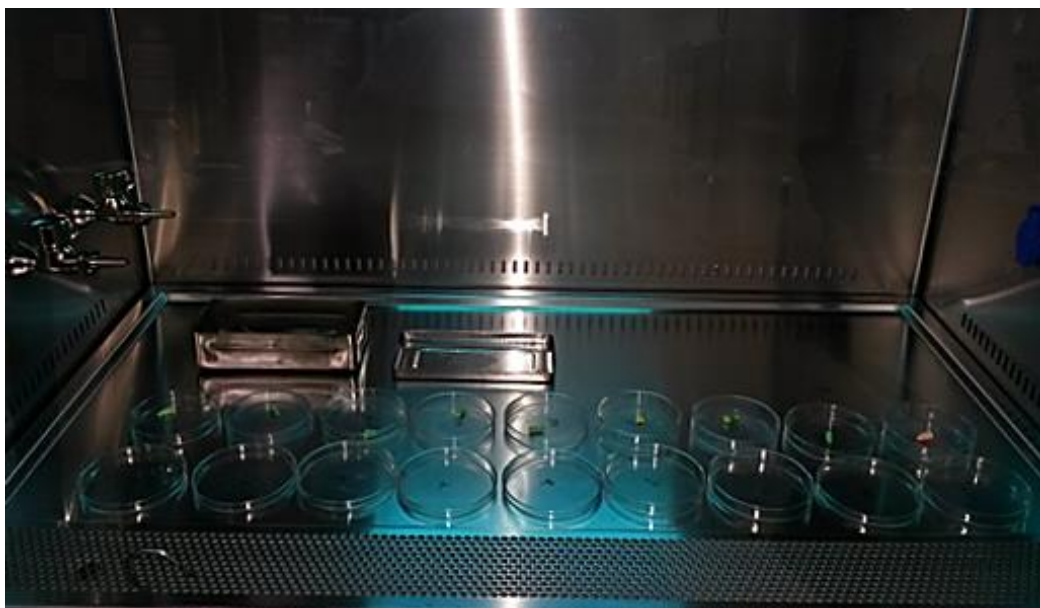


Figura 15. Muestras bajo luz UV



En los grupos de hidróxido de calcio y aceite ozonizado, se eliminó la cera de la entrada del conducto, se irrigó con 5mL de solución salina y se secó con conos de papel. Seguido, el medicamento se llevó al conducto y se introdujo en el mismo empleando la lima maestra a longitud de trabajo. Con movimientos de vaivén se aseguró la colocación de medicamento en

todas las paredes. Se presionó con una bolita de algodón para compactarlo. A continuación, se cubrió la superficie del conducto con cera pegajosa cerca de la llama. Finalmente, las muestras fueron expuestas nuevamente a 15 minutos de luz UV para eliminar cualquier contaminación producida durante la colocación del medicamento. Estos pasos, exceptuando la colocación final de cera, se realizaron en una cámara de bioseguridad A2. Seguido, se cultivaron a 37°C por 8 días (grupo de aceite ozonizado) y por 15 días (grupo de hidróxido de calcio). Las cajas Petri se colocaron en frasco GasPak sin componentes anaerobios junto con una toalla húmeda para crear un ambiente húmedo y reducir la muerte bacteriana por desecación.

Figura 16. Muestras en frasco GasPak



En el grupo de clorhexidina, se eliminó la cera de la entrada al conducto y se irrigó con 10mL de clorhexidina al 2% por 10 minutos. La irrigación se realizó a 3mm menos de la longitud de trabajo. A continuación, se irrigó con 5mL de solución salina, seguido, para neutralizar la acción de la clorhexidina, se irrigó con 1mL de Tween 80 al 3% con lecitina al 0.3% por 5 minutos. Se volvió a irrigar con 5mL de solución salina, se secaron los conductos

con conos de papel estériles y se procedió inmediatamente a la toma de la muestra. Estos pasos se realizaron en una cámara de bioseguridad A2.

En los grupos de IUP y de irrigación convencional, se irrigó con 10mL de hipoclorito de sodio al 5.25% a 3mm menos que la longitud de trabajo por 10 minutos. En el grupo de IUP se realizó activación ultrasónica empleando la lima #40 adaptada por 30 segundos a 1 mm menos que la longitud de trabajo. Seguido, en ambos grupos, se enjuagaron los restos de irrigante con 5mL de solución salina. A continuación, para neutralizar la acción del hipoclorito de sodio, se irrigó con 1mL de tiosulfato de sodio al 5% por 1 minuto. Finalmente, se irrigó con 5mL de solución salina, se secaron los conductos con conos de papel estériles y se procedió inmediatamente a la toma de la muestra. Estos pasos se realizaron en una cámara de bioseguridad A2.

Figura 17. Lima #40 adaptada al ultrasonido



Preparación de medios de cultivo

Se preparó caldo de enterococo empleando las instrucciones del fabricante (concentración de 18g por litro) disolviendo el polvo en agua destilada, agitando hasta obtener una mezcla

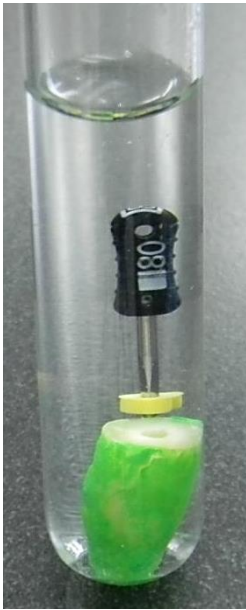
homogénea y calentando en microondas (1 minuto por cada 100mL) de ser necesario para homogenizar aún más. Seguido, se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°.

Se preparó agua peptonada empleando las instrucciones del fabricante (concentración de 0.1%) disolviendo el polvo en agua destilada, agitando hasta obtener una mezcla homogénea. Seguido, se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°.

Toma y análisis de muestras

Para los grupos de hidróxido de calcio y aceite ozonizado, una vez culminado el periodo de cultivo, se procedió a retirar la cera pegajosa y, usando 15 mL de suero fisiológico y la lima maestra, se eliminó el medicamento intraconducto. Los conductos se secaron con conos de papel estériles. Este procedimiento se realizó en cámara de bioseguridad tipo A2. Se empleó el método del número más probable (NMP) para determinar la cantidad de bacterias presentes.

En todos los grupos, se limó ligeramente el conducto de cada muestra con lima maestra (20 limadas por conducto) y se colocó tanto a la muestra como a la lima en un tubo de ensayo con 10mL de agua peptonada (1) que se llevó a vórtex por 1 minuto. Este procedimiento se realizó en cámara de bioseguridad tipo A2, con excepción de la colocación en vórtex.

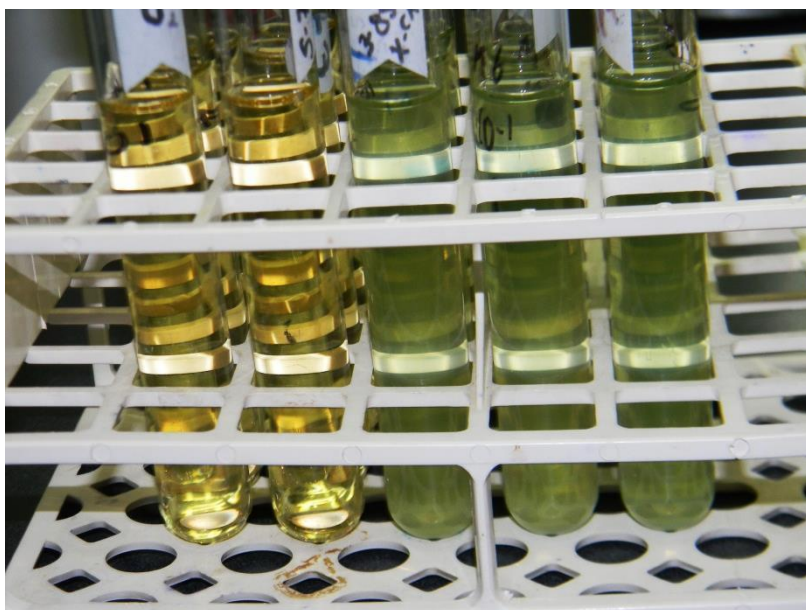
Figura 18. Toma de muestra

A continuación, se tomó una alícuota de 1mL y se llevó a 9mL de agua peptonada (10^{-1}). De esta primera dilución, se tomó 1mL y se llevó a 9mL de agua peptonada (10^{-2}). Este proceso se repitió hasta obtener diluciones 10^{-4} para las muestras y hasta 10^{-7} para el control positivo. Cada una de estas diluciones se llevó a vórtex por 30 segundos.

De cada una de estas cinco concentraciones, se tomó 1mL y se llevó a 10mL de caldo de enterococo que se colocó en vórtex por 5 segundos. Esto se repitió tres veces y así se obtuvieron tres nuevos tubos de ensayo de cada concentración (15 de cada muestra y 24 del control positivo). Las soluciones originales se descartaron. Todas las diluciones seriadas se realizaron frente a la llama para mantener la esterilidad del ambiente.

Dichas disoluciones se cultivaron por 48 horas a 35°C . Seguido, se observó cuántos tubos presentan cambio de color debido a la presencia de *E. faecalis*. Se llevó una muestra de cada tubo positivo a agar de soya tripticaasa empleando asa y se cultivó por 24 horas a 35°C para comprobar la infección pura. Las colonias que se obtuvieron se emplearon para realizar tinción gram, bilis esculina y catalasa.

Figura 19. Reacción positiva en caldo de enterococo



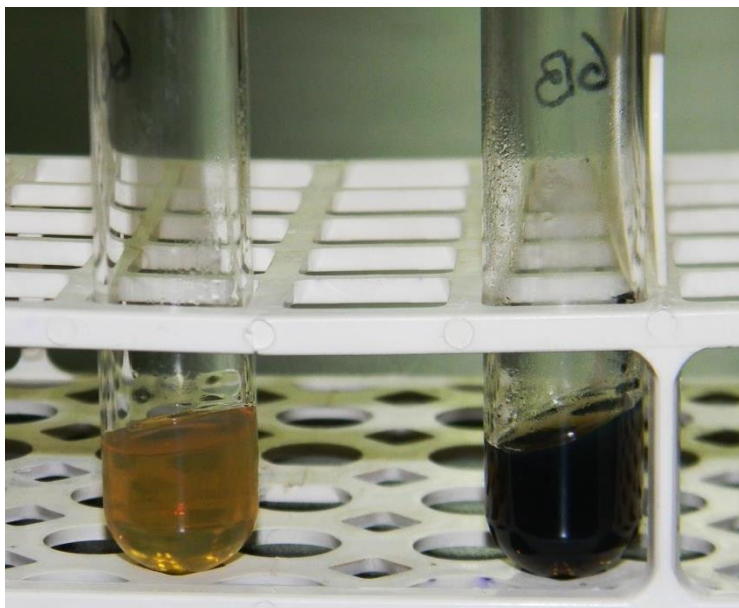
Con respecto al control negativo, éste se secó, se llevó de nuevo a caldo de soya triptica y se observó si existía crecimiento bacteriano tras 48 horas en incubadora a 35°C. En el caso de los grupos de aceite ozonizado e hidróxido de calcio, el control negativo se secó y almacenó por el periodo respectivo a su grupo en plato de agar. Seguido, se llevó a caldo de soya triptica y se incubó por 48 horas a 35°C.

Bilis esculina

Se preparó bilis esculina diluyendo de polvo en agua destilada (concentración de 43.5g por litro) y llevándolo al microondas (1 min por cada 100mL). Seguido se repartió dicha mezcla en tubos de ensayo, se los llevó a esterilización por 15min a 121°C y se los dejó enfriar.

Se tomó una colonia con asa en punta, se pinchó hasta 2/3 de profundidad en la bilis esculina y se cultivó por 24 horas a 35°C. Se realizarán dos tubos por muestra, el menos y el más diluido. Transcurrido el tiempo de cultivo se observó si la bilis esculina cambió de color ámbar a negro.

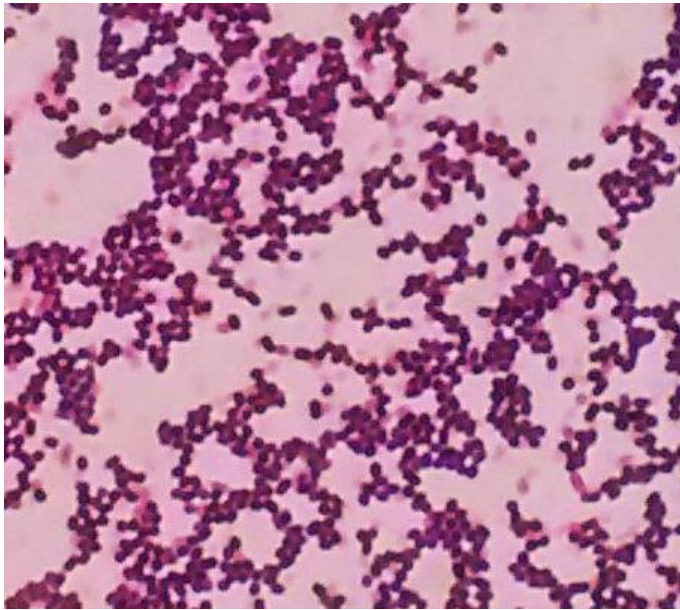
Figura 20. Reacción positiva en bilis esculina



Tinción gram

Se llevó una pequeña porción de las colonias cultivadas a una gota de suero en un portaobjetos empleando palillo estéril. Seguido, se permitió que seque la gota y se fijaron las bacterias pasando al portaobjetos por llama. La tinción gram se realizó colocando un minuto de cristal violeta y enjuagando con agua destilada; seguido, se puso alcohol yodado por un minuto y se enjuagó; después, se llevó alcohol cetona (decolorante) por 15 segundos y se enjuagó; finalmente, se empleó safranina por 30 segundos y se enjuagó. Se permitió secar a la placa y se observó bajo microscopio compuesto a un aumento de 100X la presencia de cocos gram positivos sin contaminación.

Figura 21. Imagen microscópica (100X) de cocos gram positivos



Catalasa

Empleando un palillo estéril, se llevó una colonia a una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y se observó si se producía efervescencia.

Figura 22. Reacción positiva de catalasa



Figura 23. Esquema de la metodología

Análisis estadístico

Los datos se procesaron con el sistema IBM SPSS.

4. Resultados

Los resultados se obtuvieron en forma de número más probable de bacterias (tabla 2) y se transformaron a porcentaje de reducción bacteriana con respecto a un promedio de los controles positivos de los grupos de irrigantes (3748200 bacterias) y con respecto a los controles positivos correspondientes en los grupos de medicamentos intraconducto (tabla 3). En el grupo de irrigación con clorhexidina se excluyó la muestra 6 por contaminación y se colocó un dato promedio para el análisis estadístico. Semejante, en el grupo de hidróxido de calcio se colocó el valor de cero en los casos en los que se presentaba un número de bacterias igual o mayor al grupo control (0% de reducción bacteriana).

Tabla 2. Número más probable de bacterias

Muestra	Irrigación convencional	IUP	Clorhexidina	Aceite ozonizado	Hidróxido de calcio
1	93	75	230	1500	2400
2	7,5	430	2,3	15	93
3	2,3	2,3	4,3	93	4,3
4	4,3	43	0,36	9,3	43
5	150	0,36	93	93	1500
6	240	24	61	0,30	43
7	150	230	93	230	930
8	9,3	0,30	4,3	0,30	380
Control +	240000	11000000	4600	23000	930
Control -	-	-	-	-	-

Tabla 3. Porcentaje de reducción bacteriana

Muestra	Irrigación convencional	IUP	Clorhexidina	Aceite ozonizado	Hidróxido de calcio
1	99,9975188	99,9972709	99,9916309	93,4782609	0
2	99,9997999	99,9843534	99,9999916	99,9347826	90
3	99,9999386	99,9999163	99,9998435	99,5956522	99,5376344
4	99,9998853	99,9984355	99,9999869	99,9595652	95,3763441
5	99,9959981	99,9999869	99,996616	99,5956522	0
6	99,9935969	99,9991267	99,9977804	99,9986957	95,3763441
7	99,9945419	99,9916309	99,996616	99	0
8	99,9996616	99,9999891	99,9998435	99,9986957	59,139785

La tabla 4 indica el análisis descriptivo de los grupos experimentales. En base a este análisis, se realizó la prueba de normalidad (tabla 5) y la prueba de homogeneidad de las varianzas (tabla 6). Dichas pruebas demuestran la no-normalidad de la distribución y la heterogeneidad de las varianzas ($p < 0.05$). En consecuencia, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Mann-Whitney para el análisis estadístico.

Tabla 4. Resultados de grupos experimentales

Tratamientos	Mediana	Media	Desviación estándar	Rango	Mínimo	Máximo
Irrigación convencional	99,9985902	99,99761764	0,002611196	0,00634171	99,99359693	99,99993864
IUP	99,9987811	99,9963387	0,00558421	0,01563569	99,98435339	99,99998908
Clorhexidina	99,9988119	99,9977886	0,00289825	0,00836074	99,99163089	99,99999163
Aceite ozonizado	99,7652174	98,945163	2,23493429887	6,52043478	93,47826087	99,99869565
Hidróxido de calcio	74,5698925	54,9287634	47,1489985126	99,53763441	0,00000000	99,53763441
Total	94,8662586	90,7731343	9,87900529	21,2176815	78,6895684	99,9072499

Tabla 5. Resultados de la prueba de normalidad de los grupos experimentales

Pruebas de normalidad							
	Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Porcentaje de reducción bacteriana	Irrigación convencional	0,283	8	0,058	0,835	8	0,067
	IUP	0,316	8	0,018	0,728	8	0,005
	Clorhexidina	0,261	8	0,116	0,788	8	0,021
	Aceite ozonizado	0,385	8	0,001	0,540	8	0,000
	Hidróxido de calcio	0,272	8	0,085	0,761	8	0,011

Tabla 6. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas de los grupos experimentales

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Porcentaje de reducción bacteriana			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
46.687	4	35	0,000

La prueba de Kruskal-Wallis se empleó para comprobar que el tratamiento tiene influencia sobre el porcentaje de reducción bacteriana ($p < 0,05$) (tabla 7).

Tabla 7. Prueba Kruskal-Wallis para los grupos experimentales

Prueba de Kruskal-Wallis	
	Reducción
Chi-cuadrado	24,569
Df	4
Asymp. Sig.	0,00

Finalmente, se empleó la prueba de Mann-Whitney para esclarecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$) (tabla 8). Cabe aclarar que esta prueba basa su análisis en las medianas de los grupos.

Tabla 8. Prueba de Mann-Whitney para los grupos experimentales

Tratamientos			Asymp. Sig. (2-tailed)
Prueba de Mann-Whitney	Irrigación convencional	IUP	0,834
		Clorhexidina	0,528
		Aceite ozonizado	0,012
		Hidróxido de calcio	0,001
	IUP	Clorhexidina	0,916
		Aceite ozonizado	0,012
		Hidróxido de calcio	0,001
	Clorhexidina	Aceite ozonizado	0,011

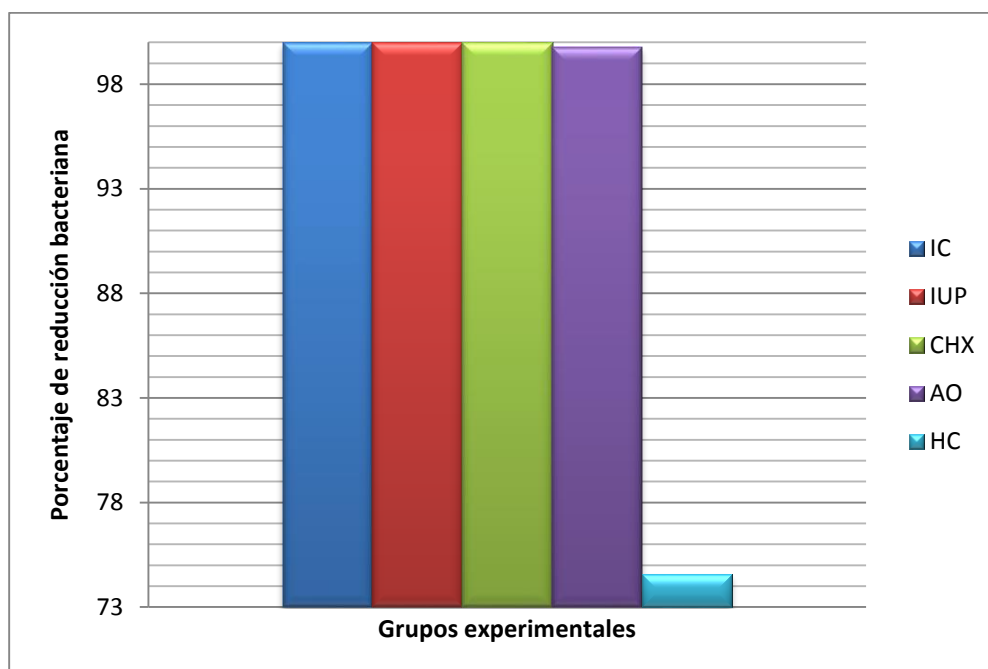
		Hidróxido de calcio	0,001
	Aceite ozonizado	Hidróxido de calcio	0,003

La tabla 8 muestra que los grupos de irrigación convencional, IUP e irrigación con clorhexidina presentan los valores más elevados de reducción bacteriana y no poseen diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Son seguidos en eficacia por el grupo de aceite ozonizado, con diferencia estadísticamente significativa con los anteriores. Finalmente, el grupo de hidróxido de calcio tiene un porcentaje de reducción bacteriana menor que los demás grupos de forma estadísticamente significativa (tabla 9) (gráfico 1).

Tabla 9. Representación de las semejanzas y diferencias entre los grupos experimentales

Tratamiento	Mediana	Semejanza/diferencia
Irrigación convencional	99,9985902	A
IUP	99,9987811	A
Clorhexidina	99,9988119	A
Aceite ozonizado	99,7652174	B
Hidróxido de calcio	74,5698925	C

Se coloca la misma letra a los tratamientos que son estadísticamente iguales

Gráfico 1. Medianas de los grupos experimentales

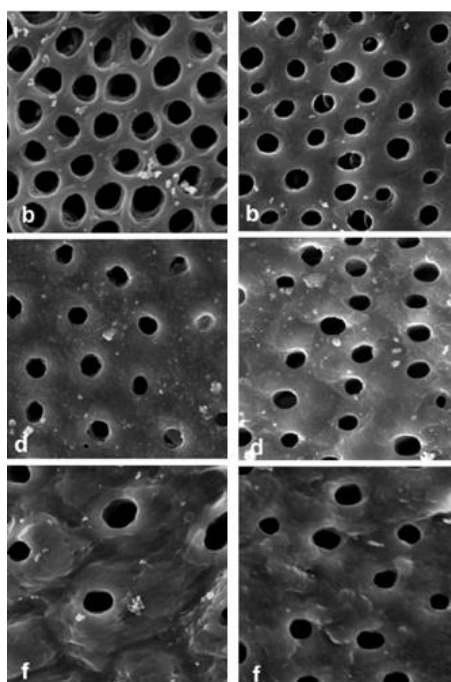
5. Discusiones

El estudio presente tuvo el objetivo de evaluar y comparar experimentalmente el grado de efectividad de las distintas técnicas de desinfección de conductos frente a *E. faecalis* en presencia de dentina. Esto se debe a que varios estudios han demostrado la capacidad amortiguadora de este tejido y su influencia en los mecanismos de acción de antimicrobianos endodóncicos como el hidróxido de calcio y la clorhexidina (Portenier, y otros, 2001; Siqueira & Lopes, 1999, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). Además, es importante tomar en cuenta la intrincada anatomía del sistema de conductos y su influencia sobre la colonización bacteriana y la actividad de las sustancias desinfectantes (Fouad, 2009).

Se emplearon incisivos de bovino debido a la gran cantidad de muestras necesarias, a su estructura relativamente uniforme y a la ausencia de caries o enfermedad periodontal (Mellberg, 1992, citado en Yasse, Platt, & Hara, 2011). Igualmente, existen semejanzas entre dientes de bovinos y de humanos con respecto a la composición de los tejidos dentales (Gazquez y Blanco, 2004, citados en Posada, y otros, 2006), a la anatomía radicular y a la

estructura microscópica de la dentina radicular (Camargo, y otros, 2007). Es así que los dientes bovinos presentan los mismos tejidos dentales que los humanos y en la misma disposición: una corona recubierta de esmalte, dentina coronal y radicular, cemento recubriendo la raíz y pulpa. De forma semejante, poseen una cámara pulpar y un conducto radicular (Gazquez y Blanco, 2004, citados en Posada, y otros, 2006). Aunque en el bovino el conducto es tres veces más amplio que en el humano (Basrani, y otros, 2002), la estructura microscópica de la dentina radicular muestra un tamaño tubular igual entre especies. No obstante, existe una mayor cantidad de túbulos en la dentina radicular de bovino (Camargo, y otros, 2007).

Figura 24. Microfotografía con microscopio de escaneo electrónico (5000X) de dentina radicular de humano (izq) y bovino (der)



Camargo, C., Siviero, M., Afonso, S., de Oliveira, S., Carvalho, C., & Valera, M. (April de 2007). Topographical, Diametral, and Quantitative Analysis of Dentin Tubules in the Root Canals of Human and Bovine Teeth. *Journal of Endodontics*, 33(4), 422-426.

b. dentina del tercio cervical, d. dentina del tercio medio, f. dentina del tercio apical

De forma similar, se eligieron las muestras que no presentasen ningún tipo de lesión o infección, un conducto relativamente recto, una amplitud inicial similar y un desarrollo radicular completo. Así, se intentó eliminar variables que pudiesen influir en la colonización bacteriana y la acción de los antimicrobianos. Sin embargo, las diferencias entre dientes de ambas especies pudieron haber influido en algunos aspectos de la infección. Es probable que más bacterias se encuentren presentes en la infección de bovino que en la humana, por el mayor número de túbulos a colonizar. No obstante, la penetración tubular probablemente fue igual por el tamaño semejante de los túbulos dentinarios entre ambas especies. Por otro lado, el gran diámetro de los conductos de bovino pudo influir en la acción de las sustancias investigadas debido a que permite un mayor volumen de las mismas (Fouad, 2009). Asimismo, este mayor calibre de conducto pudo haber mejorado la limpieza a nivel apical por un mayor contacto de los desinfectantes.

Pese a estas desventajas, al escoger dientes bovinos para el estudio se pudieron eliminar variables como la edad y anatomía variada de los especímenes humanos. Esto es de gran valor ya que dichas variables influyen notablemente en la colonización de *E. faecalis*. Así, la edad del paciente influye en su grado en la adherencia de esta bacteria ya que existen modificaciones en el colágeno a medida que se envejece (Ozgun, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010) y los túbulos se obliteran. Además, las variaciones anatómicas en dientes humanos, como distintos grados de curvatura de la raíz o la presencia de varios conductos, proporcionan superficies distintas para la colonización bacteriana y, en consecuencia, modifican la acción de los irrigantes y medicamentos.

A pesar de esto, como se puede observar en los resultados de los controles positivos, existió una amplia variación en la cantidad de bacterias presentes al momento de la toma de muestra. Esto podría explicarse por tres razones. Primero a la intrincada anatomía interna de los conductos que, además de un conducto principal, presentan varios conductos accesorios,

sitios donde se pueden alojar las bacterias (Fouad, 2009). Segundo, existe dificultad para lograr una colonización bacteriana uniforme *in vitro* (Du, y otros, 2014). Tercero, el tiempo de cultivo previo a la toma de muestra de los grupos de aceite ozonizado y de hidróxido de calcio probablemente causó desecación bacteriana o que las bacterias entren en un estado viable pero no cultivable (Bystrom & Sunquist, 1981, citados en Bolla, Raj, Iswarya, Vemuri, & Shenoy, 2012).

Por estas razones, para el análisis estadístico se decidió usar un promedio de los controles positivos de los grupos de irrigantes (irrigación convencional, IUP y clorhexidina). Esto se debe a que estos grupos tuvieron un mismo tiempo de cultivo y la toma de muestra se realizó inmediatamente tras la irrigación. Así, se intentó tener un valor de bacterias inicial más uniforme para analizar la reducción bacteriana. No obstante, para eliminar el factor de desecación bacteriana, el análisis de los grupos de medicamentos intraconducto se realizó con su control positivo respectivo.

Las muestras se cortaron a un tamaño de 15mm para estandarizar la longitud de trabajo, facilitando su preparación y creando una superficie intraconducto más uniforme para la colonización bacteriana (Dammaschke, Jung, Harks, & Schafer, 2013; Marques, y otros, 2014; Menezes, y otros, 2004; Mozayeni, Haeri, Dianat, & Jafari, 2014; Vasudev, Venkatesh, Kumar, Kundabala, & Seetharama, 2010). Con respecto a la preparación mecánica de los especímenes, se eligió una instrumentaciónápico-coronal por la mayor facilidad que presenta esta técnica. Por otro lado, la gran amplitud inicial de los conductos hizo que sea necesario emplear una lima #80 K como lima apical maestra y Gates Glidden #6 en el tercio medio y apical. De esta forma, se obtuvo un volumen intraconducto uniforme de 0,02mL de capacidad.

Para la irrigación entre lima y lima se usó suero fisiológico. Así, se lubricaron y lavaron los conductos sin exponerse a cantidades variables de hipoclorito de sodio. Seguido,

se realizó irrigación con NaOCl al 5.25% para disolver los restos de tejido orgánico. A continuación, se colocó EDTA al 17% con el fin de eliminar restos inorgánicos y permeabilizar los túbulos dentinarios. La siguiente irrigación con hipoclorito de sodio fue de 5 mL por tres minutos ya que es el tiempo en el que este irrigante ejerce su mayor potencial (Du, y otros, 2014). Finalmente, se empleó suero fisiológico para neutralizar cualquier acción residual del irrigante. Cabe destacar que se realizó una irrigación corta con hipoclorito de sodio con objeto de mantener tejido necrótico residual en el interior de los conductos.

El foramen apical se selló con resina fluida para crear un conducto cerrado e impedir cualquier contaminación a través de éste. De forma semejante, el cemento radicular se cubrió con esmalte de uñas para minimizar el crecimiento bacteriano sobre el mismo y evitar la comunicación entre el medio externo y el conducto. De esta forma, se aseguró no obtener falsos positivos durante la toma de muestra por presencia bacteriana en el cemento radicular así como por recontaminación del conducto.

Los especímenes se esterilizaron en caldo de soya tripticasa con objeto de mantener su hidratación y asegurar la penetración del caldo en los túbulos dentinarios. Se escogió este caldo como medio de cultivo ya que es nutritivo y poco selectivo; así, permite el crecimiento de bacterias aerobias, anaerobias, anaerobias facultativas y hongos (Difco & BBL, 2009). De esta forma, fue posible determinar si existió contaminación cruzada en cualquier punto del experimento.

Se eligió a la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 debido a que ha sido empleada ampliamente en estudios *in vitro* para comprobar eficacia antimicrobiana (Awawdeh, AL-Beitawi, & Hammad, 2009; Bhardwaj, Velmurugan, & Ballal, 2013; Brito, y otros, 2009; Fernandes, y otros, 2011; Jayasimha & Mylswamy, 2011; Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009; Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010; Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011; Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010; Puneetha, Champa, & Panchajanya, 2014).

Además, esta cepa presenta plásmidos de substancia de agregación (AS) y productores de gelatinasa, factores de virulencia importantes para la colonización bacteriana (Kasimoğlu, Emre, & Deniz, 2010). También, posee una susceptibilidad ante antimicrobianos estable, ideal para el análisis (Elmer, et al., 1997 citado en Awawdeh, AL-Beitawi, & Hammad, 2009).

Si bien las bacterias al interior de los conductos probablemente se encuentran en estado de inanición, su capacidad para formar biofilm es limitada. En consecuencia, se eligió un estado estacionario que permitió una mayor formación de biofilm (Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010) y un aumento en la resistencia bacteriana, con respecto a un estado exponencial (Portenier, Waltimo, Ørstavik, & Haapasalo, 2005). Así el *E. faecalis* fue incubado por 18-24 horas a 35°C de forma aerobia para obtener bacterias en estado estacionario (Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010). Por otro lado, se usó una turbiedad de 0.5 McFarland ya que ha sido empleada en numerosos estudios (Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012; Dammaschke, Jung, Harks, & Schafer, 2013; Jayasimha & Mylswamy, 2011; Joy, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011; Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007; Machado, Alves, Uzeda, Rocas, & Siqueira, 2010; Marques, y otros, 2014; Menezes, y otros, 2004; Mozayeni, Haeri, Dianat, & Jafari, 2014; Rahman, Chandra, Singh, & Chandra, 2013). Cabe aclarar que la infección *in vivo* se considera variada en morfología y estructura sin un patrón único (Kishen, 2012); además, es más severa y virulenta (Bhuva, y otros, 2010).

Tras la inoculación con *E. faecalis*, las muestras se llevaron a la centrifuga con objeto de obtener una mayor penetración de las bacterias en el interior de los túbulos dentinarios, procedimiento que ha sido descrito previamente (Ma, Wang, Shen, & Haapasalo, 2011). No obstante, se realizó una modificación con respecto al tiempo y la velocidad propuesta por Ma et al. (2011) ya que estos autores emplearon discos de dentina, contrario al presente estudio en el que se usaron raíces completas. Esto se debe a que los discos de dentina son de menor tamaño tienen menor probabilidad de fracturar los tubos de ensayo durante la centrifugación.

Sin embargo, debido a que las muestras tomadas en los grupos control presentan una gran variabilidad en la cantidad de bacterias presentes, se puede concluir que la modificación pudo no ser efectiva.

El periodo de infección fue de veintiún días para obtener un biofilm maduro, más cercano al escenario clínico y más difícil de eliminar (Du, y otros, 2014). Sin embargo, cabe destacar que existe una gran variabilidad en la literatura acerca del tiempo de cultivo ideal para probar irrigantes o medicamentos intraconducto (Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011). Por otro lado, es claro que un inóculo fresco debe ser colocado cada dos o tres días para evitar la desecación bacteriana y mantener la formación activa de biofilm (Almeida, y otros, 2014; Awawdeh, AL-Beitawi, & Hammad, 2009; Basrani, y otros, 2002; Dammaschke, Jung, Harks, & Schafer, 2013; Jayasimha & Mylswamy, 2011; Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007; Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011; Marques, y otros, 2014).

Una vez que se cumplió el periodo de incubación, los dientes se extrajeron del caldo. A continuación, fue necesario eliminar las bacterias presentes en la superficie externa de la raíz ya que su presencia influiría al momento de la toma de muestra. Para asegurar esta desinfección, se requirió sumergir a los especímenes por una hora en hipoclorito de sodio al 5.25% seguido por media hora de exposición a luz UV. En base a esto, se puede destacar el alto grado de resistencia del *E. faecalis* ya que colonizó una superficie relativamente lisa (esmalte de uñas) y se requirió de un protocolo agresivo para asegurar su completa eliminación.

Para la irrigación convencional se usó hipoclorito de sodio al 5.25% debido a que se ha demostrado que una concentración alta es más efectiva eliminando *E. faecalis*. Asimismo, el efecto antimicrobiano de este irrigante ejerce su máximo potencial en los primeros 10 minutos (Du, y otros, 2014). La irrigación se realizó a 3mm menos de la longitud de trabajo y con guja de irrigación endodóncica para simular el escenario clínico (Cohen & Burns, 2002; Soares &

Goldberg, 2007). Finalmente, con objeto de evitar falsos negativos, se empleó tiosulfato de sodio al 5% para neutralizar al NaOCl (Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010; Law & Messer, 2004; Paiva S. , y otros, 2012; Paiva s. , y otros, 2013; Retamozo, Shabahang, Johnson, Aprecio, & Torabinejad, 2010; Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013; Siqueira, Magalhães, & Rôças, 2007).

En el grupo de IUP se mantuvieron los mismos pasos que en el de irrigación convencional, excepto que se realizó la activación del irrigante con ultrasonido. Para tal activación se utilizó una lima #40 adaptada ya que el conducto de bovino es tres veces más amplio que el de humano, por lo cual no sería conveniente emplear una lima #10 o #15. Así, se trató de evitar potenciar el efecto del ultrasonido porque mientras más fina es la lima, mayor es su amplitud de desplazamiento y mayor su transmisión de energía al irrigante (Lea, et al., 2004, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Igualmente, la lima se insertó a 1mm de la longitud de trabajo y se activó por 30 segundos, como lo recomienda la literatura (Paiva S. , y otros, 2012; Paiva s. , y otros, 2013; van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007).

La irrigación con clorhexidina se realizó con una concentración del 2% ya que ha probado ser efectiva contra *E. faecalis* en estudios anteriores (Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012; Jayasimha & Mylswamy, 2011; Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007; Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011). También, se empleó un tiempo de 10 minutos porque ha sido reportado como el tiempo en el que este irrigante posee mayor acción antimicrobiana (Du, y otros, 2014). De forma semejante al grupo de irrigación convencional, la irrigación se realizó a 3mm menos de la longitud de trabajo y empleando aguja de irrigación endodóncica (Cohen & Burns, 2002; Soares & Goldberg, 2007). Para la neutralización de este irrigante se empleó Tween 80 al 3% con lecitina al 0.3%

por 5 minutos para evitar falsos negativos al momento de la toma de muestra (Paiva S. , y otros, 2012; Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013).

En el grupo de aceite ozonizado se empleó ozono al 95% ya que fue usado en una concentración de 99% en el estudio de Viera et al. (2007), realizado en modelo animal *in vivo*. El tiempo de aplicación de una semana también se basó en este mismo estudio. La colocación de aceite ozonizado se realizó con la lima maestra para alcanzar toda la longitud de trabajo y asegurar el mayor contacto posible con las paredes del conducto.

El grupo de hidróxido de calcio fue tratado con pasta de hidróxido de calcio en una proporción 1:1 con suero fisiológico. Se eligió esta consistencia ya que es considerada adecuada para la manipulación. Además, es una de las técnicas más empleadas por odontólogos en la desinfección de conductos (Ganesh, y otros, 2014). Con respecto al tiempo de incubación, se dejó al medicamento por 15 días porque es el tiempo mínimo recomendado para su aplicación. Esto se debe a que a la inflamación le toma entre 10 y 14 días desistir (Abbott, 1990, citado en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). Con respecto a la colocación del medicamento, se realizó de la misma forma que el aceite ozonizado para crear un marco comparativo entre los dos procedimientos. De forma semejante, ambos grupos se mantuvieron en frasco GasPak para crear un ambiente húmedo y disminuir la desecación bacteriana.

La eliminación del aceite ozonizado y del hidróxido de calcio se realizó utilizando la lima maestra para alcanzar la longitud de trabajo completa. Además, se empleó solución salina para mantener un ambiente isotónico y evitar la muerte de los microorganismos. En todos los grupos, se tomaron las muestras de los conductos limándolos ligeramente con la lima maestra para liberar la mayor cantidad de bacterias. Además, los especímenes se llevaron a vórtex por un minuto, método que también es considerado efectivo para la liberación bacteriana de los túbulos (Awawdeh, AL-Beitawi, & Hammad, 2009).

Cabe destacar que en el estudio Awawdeh et al. (2009) se emplearon discos de dentina (sin cemento) en vórtex por 30 segundos. Esto debe ser tomado en consideración ya que el flujo del medio de cultivo pudo haber estado reducido en los especímenes del presente estudio por su mayor tamaño y la presencia de cemento radicular y esmalte de uñas en la superficie externa. De esta forma, la cantidad de bacterias liberadas por medio de vórtex pudo ser menor en esta investigación. Igualmente, la cantidad de dentina liberada durante el limado se realizó de forma arbitraria (20 limadas del conducto) por la dificultad de medir la cantidad y estandarizar la profundidad de dentina cortada. A pesar de estas variables, se puede decir que se obtuvo la mayor cantidad de bacterias detectables y que su procedencia era del interior de los túbulos.

Con respecto al método de análisis, se eligió el número más probable (NMP) ya que ha sido recomendado para el estudio de muestras en las que se espera una cantidad reducida de bacterias (<100/g). De esta forma, cada tubo que contenga al menos un organismo viable dará un resultado positivo. Este método se basa en diluir una muestra hasta el punto en el que el inóculo en los tubos a veces contendrá bacterias viables. Así, mediante una tabla de valores (Anexo 1) establecidos por una ecuación (Anexo 2) se obtiene la cantidad más probable de bacterias en base a la cantidad de tubos positivos a cada concentración. Además, esta metodología posee un intervalo de confianza del 95% (Blodgett, 2010).

De esta manera, las muestras se llevaron a agua peptonada, medio empleado para el cultivo de microorganismos no fastidiosos (Difco & BBL, 2009). Con este medio se realizaron las diluciones maestras que fueron descartadas una vez empleadas. Así, los tubos que fueron incubados y usados en el método del NMP contenían caldo de enterococo (Chromocult Enterococco Broth). Se eligió este medio de cultivo ya que presenta un cambio de color de amarillo a verde azulado únicamente en presencia de enterococos o *Streptococo bovis*. Esto se debe a que su sustrato, X-GLU, solo puede ser fragmentado como consecuencia

de la acción de la enzima β -D glucosidasa, propia de los enterococos. Además, posee azida de sodio que inhibe el crecimiento de otros microorganismos, especialmente gram-negativos. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, las muestras se cultivaron a 35°C por 48 horas (Merck, 2005).

Una vez que se cumplió el periodo de incubación, se contó la cantidad de tubos que presentaron cambio de color. Cada tubo positivo fue analizado mediante tinción gram y catalasa. También, el tubo menos y el más diluido de cada muestra fueron analizados con prueba de bilis esculina. En el caso de la tinción gram, se observó la presencia de cocos gram positivos. Por su parte, en la prueba de catalasa se observó una reacción negativa. Finalmente, la prueba de bilis esculina debió ser positiva (Difco & BBL, 2009). Mediante estas tres pruebas se pudo comprobar la presencia de *Enterococcus s.p.*

La primera prueba que se realizó fue de bilis esculina para asegurar la presencia de *E. faecalis* y reducir la probabilidad de contaminación de los platos de agar. Si bien se obtuvieron resultados positivos de bilis esculina en todas las muestras, existió contaminación de algunas cajas Petri de los grupos de clorhexidina, aceite ozonizado e hidróxido de calcio. A pesar de ello, su análisis reveló un origen ambiental en base a las especies identificadas (estafilococos y hongo aspergillus). Además, la localización de la contaminación se presentó lejos de las cepas sembradas. De esto se pudo concluir que la contaminación ocurrió durante el análisis microbiológico de los tubos, sin influir directamente en el conteo de *E. faecalis*.

Como ya se mencionó anteriormente, solo el *S. bovis* presenta reacción en el caldo de enterococo. Además, este microorganismo es bilis esculina negativo. En consecuencia, se puede deducir que mientras haya reacción en el caldo de enterococo y en la bilis esculina, se trata de *Enterococcus s.p.* No obstante, solo una prueba de ADN puede asegurar que se trata de *E. faecalis*. A pesar de esto, la contaminación de otra cepa de enterococo es muy poco probable debido a que son bacterias entéricas, producto de una contaminación fecal (Merck,

2005); además, las colonias fueron sembradas por la autora y manipuladas en medios estériles, haciendo aún más improbable la contaminación con otro enterococo.

En general, los resultados obtenidos con el experimento se encuentran en concordancia con la literatura disponible. Así, se determinó que los grupos de irrigación convencional, IUP e irrigación con clorhexidina presentan los mejores valores de reducción bacteriana (>99,99%), seguidos por el grupo de aceite ozonizado, con un porcentaje de reducción bacteriana elevado (99.75%). Por otro lado, el grupo de hidróxido de calcio fue el tratamiento menos efectivo (74.57%). Así se acepta parcialmente la hipótesis del estudio ya que si bien la clorhexidina es una de los tres mejores tratamientos para la eliminación de biofilm de *E. faecalis*, el aceite ozonizado presentó un valor de reducción bacteriana estadísticamente menor.

Con respecto a la irrigación convencional, su elevado porcentaje de reducción bacteriana ha sido reportado previamente (Berber, Gomes, Sena, et al., 2006, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010; Du, y otros, 2014; Retamozo, Shabahang, Johnson, Aprecio, & Torabinejad, 2010). Esto puede deberse a que el hipoclorito de sodio a altas concentraciones diluye mejor los tejidos, aumenta su capacidad antimicrobiana (Khademi, Usefian & Feizianfard, 2007, citados en Rahimi, y otros, 2014) y permite una mayor penetración tubular. No obstante, el tiempo de exposición tiene mayor influencia en el grado de penetración tubular así como en su capacidad antimicrobiana (Zou, Shen, Li, et al., 2010, citados en Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010). Igualmente, el hipoclorito de sodio posee un amplio espectro (Siqueira, Batista, Fraga & de Uzeda, 1998, citados en Almeida, y otros, 2014) con acción no específica (Hülsmann, Rödiger & Nordmeyer, 2007, citados en Basrani & Haapasalo, 2012) y es antibiofilm (Valera, Silva, Maekawa, Carvalho, Koga-Ito, Camargo & Lima, 2009, citados en Rahimi, y otros, 2014). Además, se confirmó que un tiempo de irrigación de 10 minutos es adecuado para ejercer un gran potencial desinfectante.

Pese a los claros beneficios de esta técnica y al alto grado de desinfección, no se pudo obtener ningún conducto libre de bacterias, consistente con la literatura (Du, y otros, 2014; Hu, Peng, Sum, & Ling, 2010; Retamozo, Shabahang, Johnson, Aprecio, & Torabinejad, 2010; Torabinejad & Walton, 2010). Esto puede deberse a limitaciones del hipoclorito de sodio y factores de resistencia del *E. faecalis*. En caso de las limitaciones de la sustancia, cabe aclarar que el NaOCl necesita de contacto directo con las bacterias para ejercer su acción. En consecuencia, zonas como conductos laterales, ramificaciones y túbulos dentinarios pueden no ser desinfectadas (Cohen & Burns, 2002; Torabinejad & Walton, 2010).

Por su lado, el *E. faecalis* posee varios mecanismos que pueden proporcionarle resistencia al hipoclorito de sodio y a otras sustancias. En primer lugar, se encuentra su capacidad de colonizar los conductos a gran profundidad gracias a su unión a la dentina y su tamaño más pequeño que el calibre de túbulos promedio (0,8-1 μ m) (Rigden, Baier, Ramirez-Arcos, Liao, Wang & Dillon, 2009, citados en Ozgur, Dogan, Calt, Stabholz, & Steinberg, 2010). De esta forma, la colonización bacteriana tras cuatro semanas es de al menos 300 μ m (Lucena, y otros, 2013). En segundo lugar, se encuentra su alto grado de resistencia a condiciones adversas. Es así que puede mantener su presión osmótica, sobrevivir en un pH entre 2 y 11.1 (Evans, Davies, Sundqvist & Figdor, 2002, citados en Sponchiado, Pereira, Marques, da Fonseca, & França, 2014; Minana, Carner & Walker, 2001, citados en Puneetha, Champa, & Panchajanya, 2014), tolerar un ambiente con pocos nutrientes (Fouad, 2009; Siqueira, 2001, citado en Pavaskar, y otros, 2012), activar genes de resistencia (Fouad, 2009) y entrar y salir de un estado viable pero no cultivable (Bystrom & Sunquist, 1981, citados en Bolla, Raj, Iswarya, Vemuri, & Shenoy, 2012). Finalmente, se encuentra su capacidad de formar biofilm en cualquiera de sus estados (exponencial, estacionario e inanición) que hace a esta bacteria mil veces más resistente a los antimicrobianos, especialmente en un biofilm maduro (Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010).

En la irrigación ultrasónica pasiva se hace una transmisión de energía desde una lima o punta al irrigante produciendo cavitación y microtransmisión acústica (Metzger, Basrani & Goodis, 2011, citados en Kobayashi, y otros, 2014). Esto significa que hay una formación de burbujas con gran potencial energético (Brenner, et al., 2002, citado en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007) y un movimiento circular del irrigante alrededor del instrumento oscilante (Walmsley, 1987, Ahmad, et al., 1988, Lumley, et al., 1988, citados en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). En consecuencia, se produce un aumento en la temperatura y presión del irrigante (Brenner, et al., 2002, citado en van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007) así como un mayor contacto del mismo con las superficies dentales (van der Sluis, Versluis, Wu, & Wesselink, 2007). Además, existe un daño a la pared y membrana celular bacteriana (Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al., 1994 citado en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007).

Pese a estos beneficios, la IUP sola no es letal para los microorganismos (Qian Z, Sagers R, Pitt W, 1999, citado en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007) ya que los daños celulares se reparan rápido (Pitt W, McBride M, Lunceford J, Roper R, Sagers, 1994 citado en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007). De forma semejante, si bien varios autores están de acuerdo en que la IUP mejora la remoción de tejido necrótico en zonas anatómicamente complejas (Bhuva, y otros, 2010; Gutarts, Nusstein, Reader & Beck, 2005, citados en Carver, Nusstein, Reader, & Beck, 2007; Paiva s. , y otros, 2013; Rodig, Sedghi, Konietschke, Lange, Ziebolz & Hulsmann, 2010, citados en Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011), estos beneficios no se suelen observar en dientes sin dichas complejidades (Paiva s. , y otros, 2013), como es el caso de los especímenes empleados en este estudio. En consecuencia, no se observó una diferencia estadísticamente significativa con la irrigación convencional. Sin embargo, cabe aclarar que una de las muestras no presentó ninguna bacteria detectable.

Otra posible razón por la cual la IUP no es tan efectiva en mejorar las propiedades del irrigante es la presencia de tapón de vapor apical. Éste es una columna de gas que se forma de la acción del hipoclorito con el tejido orgánico (de Gregorio, Estevez, Cisneros, Heilbom & Cohenca, 2009, citados en Glassman, 2011). *In vivo*, el conducto radicular actúa como un sistema cerrado donde dicho cuerpo de gas se queda atrapado en el tercio apical (Cki, Kim, Ling, Choi, Pashley, Tay, 2009, citados en Glassman, 2011) y no puede ser eliminado introduciendo instrumentos endodóncicos (Schoeffel, 2008, citado en Glassman, 2011). Así, se piensa que la acción del irrigante puede no llegar a los últimos 3mm, dificultando la limpieza del tercio apical en clínica (de Gregorio, Estevez, Cisneros, Heilbom & Cohenca, 2009, citados en Glassman, 2011). Ya que tanto la cavitación como la microtransmisión acústica ocurren únicamente en líquidos, se puede deducir que no afectan al tapón de vapor apical (Schoeffel, 2008, citado en Glassman, 2011). Al igual que Longhi, et al. (2011), se concluye que la irrigación ultrasónica pasiva puede ayudar a la limpieza de conductos pero no de manera significativa. La acción principal es del irrigante.

La irrigación con clorhexidina al 2% por 10 minutos demostró tener un porcentaje estadísticamente igual a la irrigación con hipoclorito de sodio por el mismo tiempo. Esto puede deberse a que la clorhexidina es un antiséptico potente (Gomes, Montagner, Berber, Zaia, Ferraz, de Almeida & Souza-Filho, 2009, citados en Rahimi, y otros, 2014) con mayor acción sobre bacterias gram positivas como el *E. faecalis* (Athanasiadis, Abbott, & Walsh, 2007; Hennessey, 1973, citado en Rahimi, y otros, 2014). De esta forma, interfiere con la inhibición enzimática y precipita proteínas y ácidos nucleicos al interior de la célula (Jones, 2000, citado en Chávez de Paz, Bergenholtz, & Svensater, 2010). Además, se ha observado que neutraliza e inactiva a los lipopolisacáridos y al ácido lipoteicoico (Lee, Baik, Heui, & Lee, 2009). Igualmente, la clorhexidina ha probado ser efectiva dentro de los túbulos dentinarios (Bhardwaj, Ballal, & Velmurugan, 2012; Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani,

2007; Marques, y otros, 2014; Mozayeni, Haeri, Dianat, & Jafari, 2014; Sinha, Patil, Dodwad, Patil, & Singh, 2013; Vaghela, Kandaswamy, Venkateshbabu, Jamini, & Arathi, 2011). Inclusive, se ha reportado una eliminación completa de *E. faecalis* tras una irrigación con clorhexidina al 2% por 10 minutos (Gomes, Souza, Ferraz, et al., 2003, citados en Krithikadatta, Indira, & Dorothykalyani, 2007).

No obstante, al igual que en el grupo de irrigación convencional, la clorhexidina no fue capaz de eliminar todas las bacterias presentes en el sistema de conductos. Esto puede deberse a varias razones. Primero, se encuentra el hecho de que la dentina (Portenier, y otros, 2001) y el tejido necrótico pueden reducir sus efectos antimicrobianos (Machado, Alves, Uzeda, Rocas, & Siqueira, 2010; Portenier, y otros, 2001). Segundo, se encuentra su incapacidad para disolver tejido necrótico (Evanov, Liewehr, Buxton & Joyce, 2004, citados en Rahimi, y otros, 2014) y, tercero, que su acción sobre biofilms no es uniforme, afectando más a las bacterias superficiales (Chávez de Paz, Bergenholtz, & Svensater, 2010).

En el presente estudio se pudo observar que el aceite ozonizado presentó un grado de acción frente a *E. faecalis* muy elevado (>99%). Esto puede deberse a que el aceite ozonizado se hidroliza y produce peróxido de hidrógeno y aldehídos (Zappi, 1952, citado en Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007). Así, el peróxido de hidrógeno ataca a la membrana citoplasmática, enzimas y ácidos nucleicos; los aldehídos alteran proteínas y ácidos nucleicos (Shapiro, 1996, citado en Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007); y los lípidos insaturados, propios del aceite, causan perturbaciones letales en la membrana citoplasmática (Siqueira JF Jr, Rôças IN, Cardoso CC, Macedo SB, Lopes, 2000, citados en Vieira, Lopes, Siqueira, Macedo, & Consolaro, 2007). Además, posee un pH menor a 2 (Vinueza, 2010), letal para el *E. faecalis* (Evans, Davies, Sundqvist & Figdor, 2002, citados en Sponchiado, Pereira, Marques, da Fonseca, & França, 2014; Minana, Carner & Walker, 2001, citados en Puneetha, Champa, & Panchajanya, 2014). Es más, dos de las

muestras (6 y 8) no presentaron cantidades detectables de bacterias en el sistema de conductos.

A pesar de estos resultados satisfactorios, no se obtuvo una eliminación completa de *E. faecalis* en las demás muestras. Debido a los pocos estudios realizados empleando esta sustancia, es difícil establecer claramente cuáles son sus limitaciones y contraindicaciones. No obstante, se puede suponer que requiere de contacto directo para ejercer su acción y que su penetración no es suficiente para eliminar todas las bacterias presentes en el sistema de conductos. Otra posible causa es que el tiempo de exposición no haya sido suficiente o que la concentración haya sido inadecuada. En general, se requieren más estudios que permitan estandarizar el tratamiento con esta sustancia.

El hidróxido de calcio es una sustancia que basa su capacidad antimicrobiana en su elevado pH (12.5-12.8) (Fava, Saunders, 1999, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007) y que requiere de contacto directo para su acción (Gomes, Ferraz, Vianna, et al., 2002, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). En el estudio presente, fue el medicamento con menos capacidad antimicrobiana frente al *E. faecalis*. Esto ha sido ampliamente reportado en literatura y se puede atribuir a la capacidad amortiguadora de la dentina, a la baja solubilidad de la sustancia y a su baja capacidad de difusión (Siqueira & Lopes, 1999, citados en Athanassiadis, Abbott, & Walsh, 2007). Además, el mismo *E. faecalis* penetra profundo en la dentina y posee alta tolerancia a un pH elevado (Fouad, 2009).

Igualmente, se pudo comprobar la dificultad de colocación de este medicamento de una forma uniforme. A esto se atribuye la diferencia de acción entre las distintas muestras, a pesar que se empleó la misma técnica para la colocación de aceite ozonizado, grupo en el que se encontraron resultados más uniformes. Es más, tres de los especímenes presentaron una cantidad igual o mayor de bacterias que el grupo control. Esto puede deberse a la humedad del

hidróxido de calcio que pudo haber evitado su desecación y facilitado el crecimiento bacteriano.

Con respecto a las limitaciones del estudio, el empleo de dientes de bovino, así como la infección con *E. faecalis* ATCC29212 y la metodología de infección *in vitro*, pueden haber influido en el tipo de biofilm formado, su estructura así como sensibilidad antimicrobiana, difiriendo del escenario clínico. De forma semejante, no se incluyeron otros microorganismos para la formación de un biofilm más complejo. Además, no se tomó en cuenta al material de obturación, presente en una infección secundaria, escenario al cual sería aplicable este estudio. Es más, no existió comprobación de la formación de biofilm. No obstante, varios estudios han demostrado que el *E. faecalis* forma biofilm en la dentina empleando microscopía de escaneo electrónico (Awawdeh, AL-Beitawi, & Hammad, 2009; Liu, Wei, Ling, Wang, & Huang, 2010; Longhi, Guzzo, Jardim, Dias, & Poli, 2011).

En general, se opina que el escenario clínico presenta una infección más virulenta y resistente al obtenido *in vitro* (Fouad, 2009), por lo que el porcentaje de reducción bacteriana obtenido puede encontrarse magnificado. Igualmente, debido a la imposibilidad de emplear instrumental rotatorio o realizar cualquier tipo de control radiográfico para mantener la esterilidad de los procedimientos, la colocación de medicamentos intraconducto pudo verse comprometida y no ser ideal. Finalmente, la toma de muestra no permite verificar la profundidad de la cual provienen las bacterias.

6. Conclusiones

Bajo las condiciones *in vitro* que se realizó el presente estudio, se concluye que:

- Los grupos de irrigación convencional, IUP e irrigación con clorhexidina presentaron los mejores porcentajes de reducción bacteriana sin diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

- La IUP no mejora de forma estadísticamente significativa la capacidad de antimicrobiana del hipoclorito de sodio al 5,25%.
- El grupo de aceite ozonizado siguió a los grupos anteriores en eficacia con diferencia estadísticamente significativa.
- El grupo de hidróxido de calcio fue el tratamiento menos exitoso en eliminar *E. faecalis* del sistema de conductos con diferencia estadísticamente significativa con los otros grupos.
- Se aceptó parcialmente la hipótesis ya que el grupo de clorhexidina fue uno de los tres tratamientos con mejores resultados, pero el aceite ozonizado poseyó un resultado estadísticamente menor.
- Los grupos de irrigación convencional, IUP, irrigación con clorhexidina y aceite ozonizado presentan valores de reducción bacteriana muy elevados (>99%).
- Ninguna de las técnicas de desinfección estudiadas presentó una eliminación completa de bacterias del sistema de conductos.

7. Recomendaciones

Primero, se debe destacar que el tamaño de las muestras es reducido, por lo cual se recomienda emplear una mayor cantidad de especímenes para obtener resultados más certeros. Igualmente, debido a las diferencias en estructura y tamaño, se sugiere usar dientes humanos. De forma semejante, se puede recomendar el emplear cepas de *E. faecalis* provenientes de infecciones persistentes *in vivo*, así como la formación de un biofilm en estado de inanición y con presencia de otros microorganismos. Asimismo, se puede aconsejar estudiar la influencia de materiales obturadores en la formación de biofilm y tratamiento de conductos infectados.

Con respecto al tratamiento, debido a que ninguna de las sustancias analizadas fue capaz de proporcionar conductos libres de bacterias, se puede sugerir un estudio que combine dichas técnicas para analizar su posible potenciación. Igualmente, debido a que un estudio *in vitro* no puede recrear la complejidad del organismo humano, se aconsejan estudios *in vivo*. Para la toma de las muestras se recomienda una estandarización de la profundidad de dentina. Finalmente, para el análisis de muestras, se sugiere el combinar el cultivo de microorganismos con análisis de ADN.

8. Referencias

- Al-Ali, M., Sathorn, C., & Parashos, P. (2012). Root canal debridement efficacy of different final irrigation protocols. *International Endodontic Journal*, 45, 898-906.
- Almeida, A., Souza, M., Miyagaki, D., Bello, Y., Cecchin, D., & Farina, A. (2014). Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite Associated with Passive Ultrasonic Irrigation on Antimicrobial Activity of a Root Canal System Infected with *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. *Journal of Endodontics*, 1-5.
- Athanassiadis, B., Abbott, P., & Walsh, L. (2007). The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal Supplement*, 52(1), 64-82.
- Awawdeh, L., AL-Beitawi, M., & Hammad, M. (2009). Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. *Australian Endodontic Journal*, 35, 52-58.
- Baena, M., Sinhoreti, M., Gonini, A., Consani, S., & McCabe, J. (2009). Comparative Study of Tubular Diameter and Quantity for Human and Bovine Dentin at Different Depths. *Brazilian Dental Journal*, 20(4), 279-283.
- Basrani, B., & Haapasalo, M. (2012). Update on Endodontic Irrigating Solutions. *Endodontic Topics*, 27, 74-102.
- Basrani, B., Santos, M., Tjaderhane, L., Grad, H., Gorduysus, O., Huang, J., . . . Friedman, S. (August de 2002). Substantive Antimicrobial Activity in Chlorhexidine-Treated Human Root Dentin. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 94(2), 240-245.
- Bergenholtz, G., Horsted-Bindslev, P., & Reit, C. (2007). *Endodoncia diagnóstica y tratamiento de la pulpa dental*. México D. F.: Editorial El Manual Moderno.
- Bhardwaj, A., Ballal, S., & Velmurugan, N. (July-September de 2012). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of natural extracts of *Morinda citrifolia*, papain and aloe vera (all in gel formulation), 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide, against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, 15(3), 293-297.
- Bhardwaj, A., Velmurugan, N., & Ballal, S. (January-February de 2013). Efficacy of passive ultrasonic irrigation with natural irrigants (*Morinda citrifolia* juice, Aloe Vera and Propolis) in comparison with 1% sodium hypochlorite for removal of *E. faecalis* biofilm: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 24(1), 35.
- Bhuva, B., Patel, S., Wilson, R., Niazi, S., Beighton, D., & Mannocci, F. (2010). The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *International Endodontic Journal*, 43, 241-250.
- Biobase. (2 de marzo de 2015). *A2 Biological Safety Cabinet*. Obtenido de Biobase: <http://www.biobase.cc/productdetail.asp?Pid=178>

- Bitter, K., Noetzel, J., Volk, C., Neumann, K., & Kielbassa, A. (March de 2008). Bond Strength of Fiber Posts after the Application of Erbium:Yttrium-Aluminum-Garnet Laser Treatment and Gaseous Ozone to the Root Canal. *Journal of Endodontics*, 34(3), 306-309.
- Blodgett, R. (October de 2010). *Most Probable Number from Serial Dilutions*. Obtenido de U.S. Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm#tbl>
- Bolla, N., Raj, S., Iswarya, H., Vemuri, S., & Shenoy, A. (2012). Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Odontopaste, Chlorhexidine and Propolis as Root Canal Medicaments Against Enterococcus Faecalis and Candida Albicans. *Journal of International Dental and Medical Research*, 5(1), 14-25.
- Brito, P., Souza, L., Machado, J., Alves, F., De-Deus, G., Lopes, H., & Siqueira, J. (October de 2009). Comparison of the Effectiveness of Three Irrigation Techniques in Reducing Intracanal Enterococcus faecalis Populations: An In Vitro Study. *Journal of Endodontics*, 35(10), 1422-1427.
- Byström, A., & Sundqvist, G. (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal*, 18, 35-40.
- Camargo, C., Siviero, M., Afonso, S., de Oliveira, S., Carvalho, C., & Valera, M. (April de 2007). Topographical, Diametral, and Quantitative Analysis of Dentin Tubules in the Root Canals of Human and Bovine Teeth. *Journal of Endodontics*, 33(4), 422-426.
- Carver, K., Nusstein, J., Reader, A., & Beck, M. (September de 2007). In Vivo Antibacterial Efficacy of Ultrasound after Hand and Rotary Instrumentation in Human Mandibular Molars. *Journal of Endodontics*, 33(9), 1038-1043.
- Case, P., Bird, P., Kahler, W., George, R., & Walsh, L. (April de 2012). Treatment of Root Canal Biofilms of Enterococcus faecalis with Ozone Gas and Passive Ultrasound Activation. *Journal of Endodontics*, 38(4), 523-526.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2009, December). Biosafety in Microbiological y Biomedical Laboratories. 21(1112), 5, 290-297. HHS Publication. Retrieved from Centers for Disease Control and Prevention.
- Chávez de Paz, L., Bergenholtz, G., & Svensater, G. (January de 2010). The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria. *Journal of Endodontics*, 36(1), 71-77.
- Cohen, S., & Burns, R. (2002). *Vías de la pulpa*. Madrid: Elsevier.
- Dammaschke, T., Jung, N., Harks, I., & Schafer, E. (October-December de 2013). The effect of different root canal medicaments on the elimination of Enterococcus faecalis ex vivo. *European Journal of Dentistry*, 7(4), 442-448.
- Dhingra, S., Kumar, R., & Raghavan, V. (June de 2014). Ozone in Oral Medicine: A Review. *Oral Medicine*, 68-69.

- Difco & BBL. (2009). *Manual of Microbiological Culture Media* (2 ed.). (M. Zimbro, D. Power, S. Miller, G. Wilson, & J. Johnson, Edits.) Maryland: BD.
- Du, T., Wang, Z., Shen, Y., Ma, J., Cao, Y., & Haapasalo, M. (April de 2014). Effect of Long-term Exposure to Endodontic Disinfecting Solutions on Young and Old *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. *Journal of Endodontics*, 40(4), 509-514.
- Fernandes, C., Sanches, R., Fontana, C., Sigrist, A., Figueiredo, B., Lopes, R., & da Silveira, C. (January de 2011). Assessment of the Antibacterial Activity of Calcium Hydroxide Combined with Chlorhexidine Paste and Other Intracanal Medications against Bacterial Pathogens. *European Journal of Dentistry*, 5, 1-7.
- Fouad, A. (2009). *Endodontic Microbiology*. Baltimore: Wiley-Blackwell.
- Ganesh, M., Rampratap, V., Masamatti, V., Mujeeb, A., Jhamb, A., & Hans, J. (January-April de 2014). In vitro evaluation of antibacterial efficacy of calcium hydroxide in different vehicles. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 4(1), 56-60.
- Gangwar, A. (2011). Antimicrobial effectiveness of different preparations of calcium hydroxide. *Indian Journal of Dental Research*, 22(1), 66-70.
- Glassman, G. (January de 2011). Safety and Efficacy Considerations in Endodontic Irrigation. *The Academy of Dental Therapeutics and Stomatology*, 1-15.
- Hahn, C.-L., & Liewehr, F. (March de 2007). Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis. *Journal of Endodontics*, 33(3), 213-219.
- Harrison, A., Chivatxaranukul, P., Parashos, P., & Messer, H. (2010). The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *International Endodontic Journal*, 43, 968-977.
- Hu, X., Peng, Y., Sum, C.-p., & Ling, J. (December de 2010). Effects of Concentrations and Exposure Times of Sodium Hypochlorite on Dentin Deproteination: Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Journal of Endodontics*, 36(6), 2008-2011.
- J, S., Rôças, I., Riche, F., & Provenzano, J. (s.f.). Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol.
- Jayasimha, U., & Mylswamy, S. (April-June de 2011). The Effect of 4% Lignocaine gel, 5% Amiloride HCl and 10% Chlorpromazine on *E.faecalis*. *Journal of Conservative Dentistry*, 14(2), 160-163.
- Joy, D., Kandaswamy, D., Venkateshbabu, N., Jamini, N., & Arathi, G. (April-June de 2011). Disinfection of dentinal tubules with two different formulations of calcium hydroxide as compared to 2% chlorhexidine: As intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, 4(2), 182-186.

- Kasimoğlu, A., Emre, Y., & Deniz, N. (2010). Comparison of Virulence Gene Profiles of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Chicken Neck Skin and Faeces Isolates. *Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, 16(A), 129-133.
- Khedmat, S., & Shokouhinejad, N. (mayo de 2008). Comparison of the Efficacy of Three Chelating Agents in Smear Layer Removal. *Journal of Endodontics*, 34(5), 599-602.
- Kishen, A. (3 de March de 2012). Advanced Therapeutic Options for Endodontic Biofilms. *Endodontic Topics*, 22, 99-117.
- Kobayashi, Y., Hayashi, M., Yoshino, F., Tamura, M., Yoshida, A., Ibi, H., . . . Ogiso, B. (2014). Passive ultrasonic irrigation in the presence of a low concentration of hydrogen peroxide enhances hydroxyl radical generation and bactericidal effect against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Oral Science*, 56(1), 35-39.
- Krithikadatta, J., Indira, R., & Dorothykalyani, A. (December de 2007). Disinfection of Dentinal Tubules with 2% Chlorhexidine, 2% Metronidazole, Bioactive Glass when Compared with Calcium Hydroxide as Intracanal Medicaments. *Journal of Endodontics*, 33(12), 1473-1476.
- Kuah, H.-G., Lui, J.-N., Tseng, P., & Chen, N.-N. (March de 2009). The Effect of EDTA with and without Ultrasonics on Removal of the Smear Layer. *Journal of Endodontics*, 35(3), 393-396.
- Law, A., & Messer, H. (October de 2004). An Evidence-Based Analysis of the Antibacterial Effectiveness of Intracanal Medicaments. *Journal of Endodontics*, 30(10), 689-694.
- Lee, J.-K., Baik, J., Heui, C., & Lee, K. (February de 2009). Chlorhexidine Gluconate Attenuates the Ability of Lipoteichoic Acid from *Enterococcus faecalis* to Stimulate Toll-like Receptor 2. *Journal of Endodontics*, 35(2), 212-215.
- Liu, H., Wei, X., Ling, J., Wang, W., & Huang, X. (April de 2010). Biofilm Formation Capability of *Enterococcus faecalis* Cells in Starvation Phase and Its Susceptibility to Sodium Hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 36(4), 630-635.
- Longhi, G., Guzzo, J., Jardim, W., Dias, S., & Poli, J. (August de 2011). Effect of Ultrasonics on *Enterococcus faecalis* Biofilm in a Bovine Tooth Model. *Journal of Endodontics*, 37(8), 1128-1133.
- Lucena, J., Decker, E., Walter, C., Boeira, L., Lost, C., & Weiger, R. (2013). Antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis*: chlorhexidine versus octenidine. *International Endodontic Journal*, 46, 53-61.
- Ma, J., Wang, Z., Shen, Y., & Haapasalo, M. (October de 2011). A New Noninvasive Model to Study the Effectiveness of Dentin Disinfection by Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Journal of Endodontics*, 37(10), 1380-1385.
- Machado, J., Alves, F., Uzeda, M., Rocas, I., & Siqueira, J. (2010). Influence of Serum and Necrotic Soft Tissue on the Antimicrobial Effects of Intracanal Medicaments. *Brazilian Dental Journal*, 21(4), 295-300.

- Magalhães, C., Sanches, R., Fontana, C., Sigrist, A., Figueiredo, B., Lopes, R., & da Silveira, C. (January de 2011). Assessment of the Antibacterial Activity of Calcium Hydroxide Combined with of Calcium Hydroxide Combined with Medications against Bacterial Pathogens. *European Journal Of Dentistry*, 5, 1-7.
- Marques, A., Souza, S., dos Santos, E., dos Santos, F., Farago, P., Gomes, J., . . . Carvalho, M. (January-February de 2014). New Intracanal Formulations Containing Doxycycline or Chlorhexidine Against Enterococcus faecalis. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 15(1), 61-65.
- McGurkin-Smith, R. (2005). Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *Journal of Endodontics*, 32, 359-363.
- Menezes, L., Gadê-Neto, C., Dametto, F., de M. Sarmiento, C., & Andrade, R. (July-September de 2011). Ultrasonic irrigation in the removal of smear layer and Enterococcus faecalis from root canals. *Brazilian Journal of Oral Science*, 10(3), 221-225.
- Menezes, M., Valera, M., Jorge, A., Koga-Ito, C., Camargo, C., & Mancini, M. (2004). In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *international Endodontic Journal*, 37, 311-319.
- Merck. (2005). *Microbiology Manual* (12 ed.).
- Mohammadi, Z., Karim, M., & Shalavi, S. (2014). An Update on the Management of Endodontic Biofilms Using Root Canal Irrigants and Medicaments. *Iranian Endodontic Journal*, 9(2), 89-97.
- Mozayeni, M., Haeri, A., Dianat, O., & Jafari, A. (2014). Antimicrobial Effects of Four Intracanal Medicaments on Enterococcus Faecalis: An in Vitro Study. *Iranian Endodontic Journal*, 9(3), 195-198.
- Ozgun, H., Dogan, H., Calt, S., Stabholz, A., & Steinberg, D. (May de 2010). Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite Irrigation on Enterococcus faecalis Biofilm Colonization in Young and Old Human Root Canal Dentin: In Vitro Study. *Journal of Endodontics*, 36(5), 842-846.
- Paiva, s., Siqueira, j., Rocas, i., Carmo, f., Leite, D., Ferreira, D., & Rachid, C. (February de 2013). Molecular Microbiological Evaluation of Passive Ultrasonic Activation as a Supplementary Disinfecting Step: A Clinical Study. *Journal of Endodontics*, 39(2), 190-194.
- Paiva, S., Siqueira, J., Rocas, I., Carmo, F., Leite, D., Ferreira, D., . . . Rosado, A. (September de 2012). Supplementing the Antimicrobial Effects of Chemomechanical Debridement with Either Passive Ultrasonic Irrigation or a Final Rinse with Chlorhexidine: A Clinical Study. *Journal of Endodontics*, 38(9), 1202-1206.
- Pavaskar, R., de Noronha, I., Chalakkal, P., Pinto, M., Sabrin, K., Keny, R., . . . Kamath, A. (January de 2012). An In Vitro Study Comparing the Intracanal Effectiveness of Calcium Hydroxide- and Linezolid-based Medicaments against Enterococcus faecalis. *Journal of endodontics*, 38(1), 95-100.

- Portenier, I., Haapasalo, H., Rye, A., Waltimo, T., Ørstavik, D., & Haapasalo, M. (2001). Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *International Endodontic Journal*, *34*, 184-188.
- Portenier, I., Waltimo, T., Ørstavik, D., & Haapasalo, M. (May de 2005). The Susceptibility of Starved, Stationary Phase, and Growing Cells of *Enterococcus faecalis* to Endodontic Medicaments. *Journal of Endodontics*, *31*(5), 380-386.
- Posada, M., Sánchez, C., Gallego, G., Vargas, A., Restrepo, L., & López, J. (2006). Dientes de bovino como sustituto de dientes humanos para su uso en la odontología. Revisión de literatura. *Revista CES Odontología*, *19*(1), 63-68.
- Puneetha, Champa, C., & Panchajanya, S. (2014). An In-vitro Evaluation Of Antibacterial Activity Of Medicinal Plants And Calcium Hydroxide Against *Enterococcus Faecalis* By Modified Direct Contact Test. *Indian Journal of Dental Science*, *6*(2), 18-21.
- Rahimi, S., Janani, M., Me, L., Shahi, S., Aghbali, A., Vahid, M., . . . Ghasemi, N. (2014). A Review of Antibacterial Agents in Endodontic Treatment. *Iranian Endodontic Journal*, *9*(3), 161-168.
- Rahman, H., Chandra, R., Singh, S., & Chandra, A. (October de 2013). A combination approach to fight against *E. faecalis* and *C. albicans*. *International Journal of Contemporary Dentistry*, *4*(2), 1-5.
- Raj, U., & Mylswamy, S. (April-June de 2011). The Effect of 4% Lignocaine gel, 5% Amiloride HCl and 10% Chlorpromazine on *E. faecalis*. *Journal of Conservative Dentistry*, *14*(2), 160-163.
- Retamozo, B., Shabahang, S., Johnson, N., Aprecio, R., & Torabinejad, M. (March de 2010). Minimum Contact Time and Concentration of Sodium Hypochlorite Required to Eliminate *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, *36*(3), 320-323.
- Rossi-Fedele, G., Steier, L., Dogramaci, E., Canullo, L., Steier, G., & Poli, J. (2013). Bovine pulp tissue dissolution ability of HealOzone®, Aquatine Alpha Electrolyte® and sodium hypochlorite. *Australian Endodontic Journal*, *39*, 57-61.
- Serper, A., & Calt, S. (July de 2002). The Demineralizing Effects of EDTA at Different Concentrations and pH. *Journal of Endodontics*, *28*(7), 501-502.
- Sinha, N., Patil, S., Dodwad, P., Patil, A., & Singh, B. (January-February de 2013). Evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide paste, chlorhexidine gel, and a combination of both as intracanal medicament: An in vivo comparative study. *Journal of Conservative Dentistry*, *16*(1), 65-70.
- Siqueira, J., Magalhães, K., & Rôças, I. (June de 2007). Bacterial Reduction in Infected Root Canals Treated With 2.5% NaOCl as an Irrigant and Calcium Hydroxide/Camphorated Paramonochlorophenol Paste as an Intracanal Dressing. *Journal of Endodontics*, *33*(6), 667-672.
- Soares, I., & Goldberg, F. (2007). *Endodoncia técnica y fundamentos*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

- Sponchiado, E., Pereira, J., Marques, A., da Fonseca, L., & França, S. (2014). In vitro assessment of antimicrobial activity of *Pothomorphe umbellata* extracts against *Enterococcus faecalis*. *Indian Journal of Dental Research*, 25(1), 64-68.
- Torabinejad, M., & Walton, R. (2010). *Endodoncia principios y práctica*. Barcelona: Elsevier.
- Vaghela, D., Kandaswamy, D., Venkateshbabu, N., Jamini, N., & Arathi, G. (April-June de 2011). Disinfection of dentinal tubules with two different formulations of calcium hydroxide as compared to 2% chlorhexidine: As intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, 14(2), 182-186.
- van der Sluis, L., Versluis, M., Wu, M., & Wesselink, P. (2007). Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *International Endodontic Journal*, 40, 415-426.
- Vasudev, N., Venkatesh, G., Kumar, R., Kundabala, M., & Seetharama, K. (May de 2010). In Vitro Sustained Release of Calcium Ions and pH Maintenance from Different Vehicles Containing Calcium Hydroxide. *Journal of Endodontics*, 36(5), 862-866.
- Vieira, A., Lopes, H., Siqueira, J., Macedo, S., & Consolaro, A. (2007). Periradicular Repair after Two-Visit Endodontic Treatment Using Two Different Intracanal Medications Compared to Single-Visit Endodontic Treatment. *Brazilian Dental Journal*, 18(4), 299-304.
- Vinueza, M. (2010). *Informe de ensayo NR.69141*. Validación de desinfectantes, Quito.
- Yasse, G., Platt, J., & Hara, A. (2011). Bovine Teeth as Substitute for Human Teeth in Dental Research: A Review of Literature. *Journal of Oral Science*, 53(3), 273-282.

9. Anexos

Anexo 1. Índice de NMP y límites de confianza del 95% para una prueba de tres tubos

. For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.											
Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

Blodgett, R. (October de 2010). *Most Probable Number from Serial Dilutions*. Obtenido de U.S. Food and Drug Administration:<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm#tab1>

Anexo 2. Ecuación del NMP

$$\sum_{j=1}^k \frac{g_j m_j}{1 - \exp(-\lambda m_j)} = \sum_{j=1}^k t_j m_j$$

Blodgett, R. (October de 2010). *Most Probable Number from Serial Dilutions*. Obtenido de U.S. Food and Drug Administration:<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm#tab1>

Donde λ es la concentración o NMP,

K denota el número de diluciones,

g_j denota el número de tubos positivos en la dilución j ,

m_j denota la cantidad de la muestra original colocada en cada tubo en la dilución j ,

t_j denota el número de tubos en la dilución j .