



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“EFECTO ANTIMICROBIANO DE TRES SOLUCIONES  
IRRIGANTES SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS  
ALOJADOS EN EL CONDUCTO RADICULAR”**

TESISTA:

**OD. GABRIELA MARTÍN**

DIRECTOR:

**PROF. DRA. MARÍA R. DEL CARMEN VISVISIÁN**

**CÓRDOBA, 2014**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO



**“EFECTO ANTIMICROBIANO DE TRES SOLUCIONES  
IRRIGANTES SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*  
ALOJADOS EN EL CONDUCTO RADICULAR”**

**Trabajo de tesis para optar al título de  
Doctor en Odontología**

**Tesista: Od. Gabriela Martín**

**Directora: Prof. Dra. María R. del Carmen Visvisián**

**Co-Directora: Prof. Dra. María Gabriela Paraje**

**Asesor Científico: Prof. Consulto Dr. Omar Gani**

**2014**

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	26
MATERIALES y MÉTODOS.....	27
Estudio 1.- Evaluación del efecto inmediato y a distancia de distintos irrigantes de uso endodóntico en dientes de edades conocidas infectados con <i>E. faecalis</i> .....	27
1. A.- Infección <i>in vitro</i> de los conductos radiculares con <i>E. faecalis</i> .....	28
1. B.- Evaluación del efecto inmediato de distintos irrigantes de uso endodóntico, en conductos radiculares infectados con <i>E. faecalis</i> .....	31
1. C.- Evaluación del efecto a distancia de distintos irrigantes de uso endodóntico, en conductos radiculares infectados con <i>E. faecalis</i> .....	34
Estudio 2: Evaluación de la permeabilidad dentinaria a <i>E. faecalis</i> en dos grupos etarios.....	36
RESULTADOS.....	42
Estudio 1. A.1-Infección <i>in vitro</i> de los conductos radiculares con <i>E. faecalis</i> .....	42
1. A.2-Evaluación de la infección de los conductos con MEB.....	42
1. B.-Evaluación del efecto inmediato de distintos irrigantes de uso endodóntico, en conductos radiculares infectados con <i>E. faecalis</i> .....	46
Acción inmediata de los irrigantes en cada grupo etario.....	49
1.C.- Evaluación del efecto a distancia de distintos irrigantes de uso endodóntico en conductos radiculares infectados con <i>E. faecalis</i> .....	54
Control bacteriológico a distancia en cada grupo etario.....	59
Estudio 2: Evaluación de la permeabilidad dentinaria a <i>E. faecalis</i> en dos grupos etarios.....	65
2 A.- Evaluación de la infección de los conductos con CONFOCAL.....	68
DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIONES.....	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

**RESUMEN** Con el propósito de evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de diferentes soluciones irrigantes sobre *E.faecalis* en el conducto radicular; se realizaron 2 estudios: 1.- evaluación del efecto inmediato y a distancia de distintos irrigantes de uso endodóntico, en dientes de edades conocidas infectados con *E.faecalis*. 2- evaluación de la permeabilidad dentinaria a *E.faecalis* en dos grupos etarios. Para tal fin, se seleccionaron 106 piezas dentarias humanas extraídas, las cuales se dividieron en dos grupos etarios: A- menores de 25 años y B- mayores de 50 años. Para el estudio 1, se utilizaron 88 premolares unirradiculares, que luego de una adecuada limpieza y preparación, se infectaron con un inóculo de *E.faecalis* ATCC 29212 y se incubaron a 37°C durante 60 días. Posteriormente se instrumentaron con el Sistema ProTaper y se dividieron en 6 subgrupos según el protocolo de irrigación: 1-NaOCl 1% + EDTA; 2-NaOCl 2,5% + EDTA; 3-NaOCl 5,25% + EDTA; 4-NaOCl 1% + MTAD; 5-NaOCl 1% + EDTA + IPI; 6-NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25 %. Se tomaron 5 muestras bacteriológicas del conducto. La primera después de infectar el conducto y antes de instrumentarlo; la segunda, inmediatamente después de la irrigación final; la tercera, cuarta y quinta a los 2, 7 y 30 días respectivamente. Las muestras fueron sembradas en placas de agar e incubadas a 37°C. Transcurridas 48 hs se realizó el recuento de UFC/ml. Para el estudio 2 se utilizaron 18 caninos, los cuales se dividieron en 2 grupos etarios. Se talló una cavidad en la superficie externa de la raíz para eliminar el cemento radicular. Se montaron los dientes en un modelo experimental, compuesto por dos frascos sellados, lo cual permitió infectar los conductos con un inóculo de *E.faecalis* a través de la corona en el frasco superior, llenando el inferior con medio de cultivo estéril. Se controló durante 30 días y la turbidez del frasco inferior indicó cultivo positivo. Para el análisis estadístico del estudio 1, se aplicó el test ANOVA, Kruskal- Wallis, Mann-Whitney; y para el estudio 2, el de Wilcoxon. En el estudio 1, el desarrollo de *E.faecalis* fue mayor en premolares menores de 25 años. En el control bacteriológico inmediato, el protocolo de irrigación más efectivo fue NaOCl 1% + EDTA + IPI. En orden decreciente le siguieron: NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%; NaOCl 1% + MTAD; NaOCl 5,25% + EDTA; NaOCl 2,5% + EDTA e NaOCl 1% + EDTA. A los 30 días no se observó reinfección de los conductos con NaOCl 1% + EDTA + IPI; NaOCl 1% + EDTA e NaOCl 2,5% + EDTA. En el estudio 2, todos los caninos menores de 25 años fueron permeables a *E.faecalis*, mientras que sólo el 78% en los mayores de 50 años. Se concluye que los agentes irrigantes experimentados demostraron ser efectivos para reducir *E.faecalis* del conducto radicular, a pesar que con ninguno de ellos se erradicaron totalmente las bacterias del conducto. El uso de un agente antimicrobiano en la etapa final de la irrigación aumentó la desinfección del conducto radicular.

**ABSTRACT** The aim of the present study was to evaluate *in vitro* the effectiveness of different irrigating solutions on *E.faecalis* in root canals. Two studies were developed: 1.- evaluation of immediate and long term residual effects of different endodontic irrigants on *E.faecalis* biofilms in root canals. 2.- evaluation of dentin permeability to *E.faecalis* in two age groups. 106 freshly extracted human teeth were selected for this experiment, distributed into 2 groups, according to the patient age: A- younger than 25 year old and B- older than 50 year old. After adequate preparation of the teeth, 88 premolars were used for the first study, that were infected with *E.faecalis* ATCC 29212 and incubated for 60 days at 37°. Following this incubation, the premolars were instrumented with ProTaper system and divided into 6 groups according to irrigation protocols: 1-NaOCl 1% + EDTA; 2-NaOCl 2,5% + EDTA; 3-NaOCl 5,25% + EDTA; 4-NaOCl 1% + MTAD; 5-NaOCl 1% + EDTA + IPI; 6-NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25 %. Five bacteriological samples were taken from the root canals: the first one before instrumentation and irrigation, the second one immediately after the final irrigation; the third, fourth and fifth one at 2, 7 and 30 days. The samples were plated on agar and incubated at 37° for 48 hours. The colony forming units (CFUs) grown were counted. For the second study, 18 canines were selected, that were divided into 2 age groups. A cavity was done on the external root surface to eliminate radicular cementum and they were mounted into an experimental model of two sealed flasks. The root canals were infected with *E.faecalis* through the access cavity in the upper flask and the lower one was filled with sterile growth broth. The turbidity of the lower flask was checked for 30 days and it indicated positive culture. The statistical analyses was done by ANOVA test, Kruskal- Wallis and Mann-Whitney test for the first study; and Wilcoxon test was applied for the second study. In the first study, premolars younger than 25 year old revealed higher values of CFU/ml of *E.faecalis* than older specimens. The antibacterial immediate study demonstrated that NaOCl 1% + EDTA + IPI was the most effective protocol to reduce *E.faecalis* in root canals, followed by: NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%; NaOCl 1% + MTAD; NaOCl 5,25% + EDTA; NaOCl 2,5% + EDTA and NaOCl 1% + EDTA. Root canal reinfection was not observed with NaOCl 1% + EDTA + IPI; NaOCl 1% + EDTA and NaOCl 2,5% + EDTA at 30 days. In the second study, all canines younger than 25 year old revealed dentin permeability to *E.faecalis*, while only 78% of 50 year old specimens. It could be concluded that although *E.faecalis* was not totally eradicated with any irrigation protocol, the tested irrigating solutions were effective to reduce *E.faecalis* in the root canals. The final rinse with an antibacterial solution increased root canal disinfection.

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos y sus productos son considerados la principal causa etiológica de necrosis pulpar y lesiones periapicales. Las bacterias presentes en las infecciones endodónticas primarias son neutralizadas, en la mayoría de los casos, a través de las etapas del tratamiento endodóntico: instrumentación, irrigación, obturación del conducto radicular y restauración definitiva de la pieza dentaria. Sin embargo, aún después de un meticuloso tratamiento, debido entre otros factores, a la compleja anatomía del sistema de conductos radiculares; los restos orgánicos, las bacterias y sus productos de desecho localizados en la profundidad de la dentina radicular no pueden ser eliminados.

Todo ello puede conducir al fracaso del tratamiento endodóntico y, por ende, al desarrollo de una infección secundaria en el interior del conducto y a complicaciones que se extienden hacia los tejidos de sostén. La flora microbiana, en estos casos, es diferente a las infecciones primarias, ya que en el conducto predomina el *Enterococcus faecalis*, un microorganismo difícil de eliminar.

Esta bacteria tiene la habilidad de desarrollarse con escaso aporte de nutrientes y sin el sinergismo de otras bacterias, es tolerante a las condiciones ecológicas del conducto radicular durante y después del tratamiento endodóntico, ya que se vuelve más resistente a la acción de los irrigantes.

Debido a la complejidad del sistema de conductos, con la sola instrumentación, no es posible acceder a todas sus irregularidades y lograr la total limpieza del mismo. La irrigación constituye un paso fundamental, ya que incrementa la acción que ejercen los instrumentos sobre las paredes dentinarias, permitiendo la limpieza y la desinfección de los conductos radiculares. Por tal motivo, es importante el efecto que ella tiene tanto para arrastrar restos orgánicos y virutas dentinarias como para mantener húmedo el conducto, a los efectos de que actúe como lubricante en el trabajo de los instrumentos endodónticos. Pero también es importante su acción antimicrobiana, su composición química, su concentración y el contacto directo que tenga con las bacterias.

Un irrigante ideal es aquel que a bajas concentraciones es capaz de inhibir el desarrollo bacteriano sin producir daño a los tejidos perirradiculares. Pero en la actualidad no hay un agente que reúna todas las condiciones, por lo cual se hace necesario combinar diferentes soluciones de irrigación.

En el presente estudio se evaluará la acción antimicrobiana de dos compuestos halogenados y otro asociado a un antibiótico, usando una solución quelante en todos los casos.

## MARCO TEÓRICO

La presencia de microorganismos ha demostrado ser la principal causa de patologías pulpares y, por extensión, de lesiones en el periápice, tanto antes como después de efectuado el tratamiento endodóntico. Por este motivo, la eliminación de la mayor cantidad posible de bacterias presentes en los conductos radiculares infectados, constituye uno de los objetivos del tratamiento endodóntico (Sundqvist y col 1982; Baumgartner y col 1992).

Si bien es fácil acceder y eliminar las bacterias presentes como células flotantes en el conducto principal de la raíz mediante la instrumentación e irrigación, no ocurre lo mismo con aquellas que, organizadas en biofilm, se encuentran adheridas a las paredes del conducto o localizadas en istmos, conductos laterales, túbulos dentinarios y otras anfractuosidades, ya que son, sin duda, difíciles de alcanzar y erradicar. Por lo tanto, el control de la infección es un paso importante en el tratamiento de las lesiones periapicales crónicas de origen bacteriano (Waltimo y col 2005).

Rocas y col (2011) consideran que las infecciones endodónticas pueden clasificarse, de acuerdo a su localización anatómica, en intrarradicular y extrarradicular. Las **infecciones intrarradiculares** son provocadas por microorganismos que colonizan el sistema del conducto radicular y, según el momento en que los microorganismos se desarrollan, se las puede subdividir en tres categorías: **infección primaria**, causada por microorganismos que invaden y colonizan el tejido pulpar necrosado; **infección secundaria**, provocada por especies que no estaban presentes en la infección primaria y llegan al conducto durante o después de la intervención profesional; y la **infección persistente** causada por los microorganismos que componían la infección primaria y secundaria y resistieron, de alguna manera, los procedimientos antimicrobianos empleados; multiplicándose en un ambiente aparentemente privado de nutrientes, como es un conducto tratado endodónticamente. Estas dos últimas situaciones son, en la mayoría de los casos, imposibles de diferenciar en la clínica, excepto en los casos de infección secundaria en los que los signos y/o síntomas de infección surgen en un diente previamente no infectado.

La **infección extrarradicular** se caracteriza por una invasión microbiana de los tejidos perirradiculares que proviene de la infección intrarradicular, aunque puede no depender de ella. En este contexto, comprender los aspectos microbiológicos, es la base de la práctica endodóntica y se fundamenta en la evidencia científica. La primera observación registrada de la presencia de bacterias en el conducto radicular data del siglo XVII, cuando Antony van Leeuwenhoek (1632-1723), un holandés aficionado a construir microscopios, describió que los conductos radiculares de un diente cariado “estaban llenos de una sustancia blanda y esa sustancia estaba viva”. En 1894,



Willoughby Dayton Miller, dentista americano que trabajaba en el laboratorio de Robert Koch, en Berlín, Alemania, publicó un estudio en el que describía la asociación entre las bacterias y las periodontitis periapicales, después de analizar las muestras obtenidas de conductos radiculares; y las clasificó, según su morfología, en cocos, bacilos y espiroquetas.

Rappe y col (2003) señalan que morfológicamente la microbiota endodóntica era claramente distinta en la porción coronaria, media y apical del conducto radicular. Las espiroquetas eran más abundantes en los abscesos y se sospechó su función etiológica. La mayoría de las bacterias que Miller había podido observar con el microscopio óptico no se podían cultivar con la tecnología disponible en aquellos momentos. Esas bacterias eran anaerobias y para cultivarlas debieron transcurrir entre 50 y 100 años. Pese a todo, aplicando las técnicas de cultivos actuales, aún no se puede cultivar un gran número de especies bacterianas del conducto radicular.

Basándose en sus resultados, Miller (1894) planteó por entonces la hipótesis de que las bacterias eran los agentes causales de la periodontitis periapical, y setenta años después, sus suposiciones fueron confirmadas por Kakehashi y col (1965).

La participación de las bacterias en la etiología de las periodontitis periapicales fue nuevamente confirmado por Sundqvist y col (1976), quienes aplicaron técnicas avanzadas de cultivos anaerobios para estudiar las bacterias existentes en conductos con pulpas necrosadas por un traumatismo. Las bacterias se detectaban sólo en dientes con signos radiográficos de periodontitis periapical, confirmando la etiología infecciosa de esta enfermedad. Las bacterias anaerobias representaron más del 90% de las aisladas. Los resultados de dicho estudio también sirvieron para demostrar que, en ausencia de infección, el tejido necrótico de la pulpa no puede inducir ni perpetuar las lesiones periapicales.

Moller y col (1981) también aportaron sólidas evidencias sobre la causa microbiana de la periodontitis periapical. Su estudio, realizado en monos, demostró que sólo las pulpas necrosadas e infectadas inducían lesiones en el periápice, ya que en los casos con pulpas desvitalizadas pero no infectadas, no se observaron cambios patológicos importantes en los tejidos perirradiculares. Además, de corroborar la importancia de los microorganismos en el desarrollo de la periodontitis periapical, estos autores, confirmaron que el tejido necrótico de la pulpa es incapaz, por sí solo, de inducir y mantener una lesión de periodontitis periapical.

Los microorganismos de la **infección primaria intrarradicular**, que a menudo llegan a la pulpa a través de una caries en las primeras fases de la invasión, generan inflamación y posterior necrosis del tejido. También pueden ser los últimos en llegar, con la presencia de una comunidad muy variada, dominada notoriamente, por

bacterias anaerobias. El número de microorganismos oscila entre  $10^3$  y  $10^8$  por conducto (Sakamoto y col 2007; Vianna y col 2006). Los estudios moleculares demuestran la presencia de una media de 10 a 20 especies o filo tipos por conducto infectado (Muños y col 2002); y los conductos de dientes que presentan fístulas contienen una media de 17 especies (Rocas y col 2008).

Las bacterias que se detectan con mayor frecuencia en las infecciones primarias, incluidos los abscesos, pertenecen a diversos géneros gram-negativos: *Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Campylobacter* y *Veillonella*. También se han aislado anaerobios gram-positivos del género de *Parvimonas*, *Filifactor*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Pseudoramibacter*, como así también streptococos facultativos o microaerofilicos (Baumgartner y col 1999, Fouad y col 2002).

Siqueira y col (2005) estudiaron la microflora endodóntica con metodología molecular, reacción en cadena de la polimerasa PCR, y observaron la presencia de *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Treponema socranski* en infecciones primarias; especies que anteriormente no habían sido halladas con técnicas de cultivo. La prevalencia de las bacterias en las infecciones primarias varía en cada estudio, ya que depende de múltiples factores, como la sensibilidad y especificidad de los métodos de detección e identificación, la técnica de obtención de la muestra, la localización geográfica y la concordancia o divergencia entre el diagnóstico clínico y la clasificación de la enfermedad.

Autores como Munson y col (2002); Sakamoto y col (2006) sostienen que alrededor de un 40-55 % de la microbiota endodóntica en las infecciones primarias está compuesta por especies que aún no se han cultivado. Otros estudios moleculares (Sakamoto y col 2006) han demostrado la aparición de filotipos no cultivados que pertenecen a varios géneros, como *Synergistes*, *Dialister*, *Prevotella*, *Solobacterium*, *Olsenella*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Megasphaera*, *Veillonella* y *Selenomonas*, así como otros filotipos relacionados con la familia *Lachnospiraceae* o el filo TM7 (Siqueira y col 2005; Saito y col 2006). Algunos filotipos no cultivados pueden encontrarse incluso entre las bacterias más prevalentes de las infecciones intrarradiculares primarias y otros se asocian a la presencia de dolor. Los filotipos con mayor prevalencia en las infecciones endodónticas son el clon BA121 de *Synergistes* y el clon X083 de *Bacteroidetes* (Siqueira y col 2007).

Para De Sousa y col (2003); Khemaleelakul y col (2002), la **periodontitis periapical aguda y el absceso periapical agudo** son ejemplos típicos de infecciones endodónticas sintomáticas. En estos casos, la infección se localiza en el conducto pero también alcanza los tejidos perirradiculares; y en los abscesos se puede

diseminar hacia otros espacios anatómicos. Los abscesos periapicales agudos son causados por bacterias que salen del conducto radicular infectado e invaden los tejidos perirradiculares para establecer una infección extrarradicular y provocar una inflamación purulenta. En la clínica, la enfermedad provoca inflamación, dolor y puede llegar a los senos y otros espacios de la cara y cuello, provocando celulitis u otras complicaciones. La microbiota involucrada en los abscesos endodónticos es mixta y está dominada por bacterias anaerobias.

### **Infecciones persistentes. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)**

La microbiota del conducto radicular en las **infecciones secundarias y persistentes**, asociadas a fracasos de **dientes tratados endodónticamente**, con periodontitis periapical, presentan menor diversidad de bacterias en comparación con las infecciones primarias. Los conductos, aparentemente bien tratados, albergan entre 1 y 5 especies; pero cuando el tratamiento es inadecuado puede ascender de 10 a 30 especies (Pinheiro y col. 2003; Sunqvist y col. 1998). El número de células bacterianas en los dientes tratados endodónticamente varía de  $10^3$  a  $10^7$  por conducto (Sedgley y col 2006; Peciulienė y col 2001).

Siqueira y col (2004) evaluaron el estado microbiológico en dientes tratados endodónticamente con periodontitis periapical persistente y observaron que la flora predominante (69%), era de anaerobios facultativos gram-positivos. Además, con PCR se estudió la flora microbiana asociada a los fracasos de tratamientos endodónticos y quedó demostrado que *E. faecalis* presenta una prevalencia en el 77% de los casos, apareciendo cuatro especies anaeróbicas, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Propionibacterium propionicum*, *Filifactor alocis* y *Dialister Pneumosintens* que, hasta el momento, no habían sido identificadas.

Por otra parte, Molander y col (1998) demostraron que *E. faecalis* es el responsable del 90 % de las infecciones enterocóccicas en humanos. Peciulienė y col (2000) y Pinheiro y col (2003) observaron que esta bacteria estaba presente en el 90% de dientes tratados endodónticamente, con lesión periapical. Dichos conductos tienen nueve veces más probabilidades de contener *E. faecalis* que los casos de infecciones primarias, lo que indica que esta especie podría ser inhibida por otras bacterias que habitualmente están presentes en las infecciones primarias, pero su supervivencia se debería a las condiciones adversas de los conductos radiculares mal obturados (Rocas y col 2004).

El hecho que *E. faecalis* haya sido aislado de dientes tratados en varias visitas o aquellos casos que quedan abiertos para drenaje, indicaría que esta especie podría ser un invasor secundario, resistente al tratamiento endodóntico, generando una

infección persistente (Siren y col 1997).

*E. faecalis* tiene la capacidad de invadir los túbulos dentinarios donde sobrevive, en condiciones adversas, por períodos prolongados sin nutrientes (Love 2002; Sedgley y col 2005). La capacidad de esta bacteria de penetrar en los túbulos dentinarios, a veces hasta zonas muy profundas, le permitiría escapar a la acción de los instrumentos e irrigantes endodónticos, utilizados durante la preparación químico-mecánica (Haapasalo y col 1987, Siqueira y col 1996). Además, su capacidad de formar biofilm en los conductos radiculares puede ser un factor importante para su resistencia y persistencia después de los procedimientos antimicrobianos del conducto (Distel y col 2002).

Por otra parte, se ha demostrado que *E. faecalis* es resistente al hidróxido de calcio (Bystrom y col 1985). Esta capacidad de resistencia a valores elevados de pH, parecería estar relacionada a una bomba de protones funcionantes que dirige a estos hacia la célula para acidificar su citoplasma (Evans y col 2002). A diferencia de la mayoría de los posibles patógenos endodónticos que encontramos a menudo en las infecciones primarias, *E. faecalis* puede colonizar los conductos radiculares en las infecciones simples (Sundqvist y col 1998) y esta independencia relativa que le permite vivir sin tener que obtener los nutrientes de otras bacterias podría ser importante para poder desarrollarse en los conductos radiculares ya tratados endodónticamente.

Las características del entorno pueden regular la expresión genética de *E. faecalis* y permitir que esta bacteria pueda adaptarse a condiciones adversas (Jett y col 1994). De esta manera, puede entrar en un estado denominado viable pero no cultivable (VPNC), que consiste en un mecanismo de supervivencia adoptado por varias bacterias cuando se exponen a condiciones ambientales desfavorables (Lleo y col 2001). En ese estado VPNC, las bacterias pierden su capacidad de crecer en medios de cultivo, pero mantienen la viabilidad y la patogenicidad y; en ocasiones, pueden reiniciar su división cuando se restauran las condiciones ambientales óptimas. Se ha demostrado que *E. faecalis* tiene la capacidad de sobrevivir en entornos con escasez de nutrientes y después vuelve a proliferar cuando se restablece la fuente de nutrientes.

Asimismo, posee la capacidad de recuperarse de un estado prolongado de latencia en los conductos obturados, lo que indica que las células viables de esta especie que quedan en el conducto en el momento de la obturación del mismo, pueden crear un nido de supervivencia a largo plazo, dando lugar a una infección en el futuro (Sedgley y col 2005). La aparición de bacterias que se mantienen en latencia y pasan a estado de biofilm, es un factor importante en la resistencia a los agentes

antimicrobianos. Las bacterias crecen lentamente, en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes en un biofilm y, en consecuencia, son mucho menos susceptibles que las células que se dividen con mayor rapidez. La mayoría de los antibióticos requiere, al menos, un cierto grado de actividad celular para ser eficaces; por lo tanto, las bacterias organizadas en biofilm, en la fase estacionaria podrían representar un mecanismo general de resistencia a los antibióticos (Hall-Stoodley y col 2004).

Entre los factores de virulencia potencial y definidos de *E. faecalis* podrían mencionarse citolicinas, agregado de sustancias, ácido lipoteicoico y enzimas líticas. Por otra parte, la susceptibilidad de *E. faecalis* frente a los irrigantes es diferente en sus fases de crecimiento, estacionaria e inanición. Se ha demostrado que en esta última, es más resistente al hipoclorito de sodio, clorhexidina e hidróxido de calcio que en su estadio de desarrollo (Portenier y col 2005).

Los hongos aparecen sólo ocasionalmente en las infecciones primarias, pero se han detectado especies de *Candida* en dientes tratados endodónticamente hasta en el 18% de los casos (Molander y col 1998) y en periodontitis periapicales persistentes (Nahir y col 1990, Waltimo y col 1997); siendo *Candida albicans* la especie detectada con mayor frecuencia, por su capacidad de colonizar e invadir la dentina (Sen y col 1997, Siqueira y col 2002) y la resistencia al hidróxido de calcio (Waltimo y col 1999).

Al tratarse de una enfermedad infecciosa, el tratamiento endodóntico de la periodontitis periapical pretende erradicar la infección existente o impedir que los microorganismos infecten el conducto radicular y los tejidos perirradiculares. Por tal motivo, la **conformación y limpieza del conducto radicular**, a través de la instrumentación e irrigación, tienen como objetivo remover el tejido necrótico, como así también, eliminar los microorganismos y sus toxinas, creando un espacio adecuado para la posterior obturación (Schilder 1974, Weine 1996). Pero en algunos casos no se logra la completa erradicación de los microorganismos, debido a la habilidad que tienen los mismos de desarrollarse en la profundidad de la dentina radicular, donde no llega la acción de los instrumentos, y a veces, los irrigantes, pues no todos penetran a través de los túbulos dentinarios. La complejidad anatómica del sistema de conductos radiculares dificulta la instrumentación y desinfección de los mismos (Cunningham y col 1993, Peters y col 2001).

### **Instrumentación de los conductos radiculares**

En la preparación del conducto, la **instrumentación** tiene la finalidad de conformar adecuadamente la cavidad pulpar, de manera que facilite la posterior obturación endodóntica. Schilder (1974) señala que la instrumentación del conducto

radicular debe ser realizada tridimensionalmente, con una conicidad continua desde la apertura cameral hasta la constricción; y el foramen no debe ser transportado, manteniendo su posición y tamaño original.

Durante muchos años estas maniobras se realizaron en forma manual, empleando los instrumentos endodónticos tradicionales de acero inoxidable, con conicidad del 2%, y aplicando técnicas estandarizadas o incrementales. Luego se comenzaron a usar las fresas de Gates-Glidden y de Peeso, para la preparación temprana de los accesos radiculares en tercio coronario y medio del conducto. Estas fresas de acero inoxidable son rígidas; y la mayoría de los errores de procedimiento que ocurre durante la instrumentación, se debe a la rigidez del metal; por esto surge la necesidad de un nuevo material.

Civjan y col (1975) fueron los primeros en sugerir la aleación de níquel-titanio, llamada NiTi, para la fabricación de instrumentos endodónticos. Las ligas metálicas de níquel-titanio fueron desarrolladas en el Laboratorio de Artillería Naval de la Marina Americana por sus propiedades antimagnéticas y resistencia a la corrosión por el agua salada. Recibieron el nombre genérico de Nitinol (Nickel-titanium Naval Ordnance Laboratory), y el auge del níquel-titanio surgió en la década de los sesenta, al ser utilizado por la NASA, principalmente en la fabricación de antenas de naves y satélites espaciales. Walia y col (1988) refirieron el uso del alambre de ortodoncia de Nitinol para la fabricación de limas endodónticas manuales.

En 1991 aparecen los primeros instrumentos manuales de níquel-titanio en endodoncia, con mayor flexibilidad elástica que las de acero inoxidable. A partir de la década de los noventa, las empresas fabricantes comienzan a producir limas manuales y rotatorias de níquel-titanio, ya que poseen mayor resistencia a la fractura por torsión, por la elasticidad que le confiere este metal al instrumento; con lo cual se introduce un nuevo concepto de preparación mecanizada rotatoria del conducto radicular. Para tal fin, se utilizan piezas de mano accionadas por motores de baja velocidad, con torque adecuado. Los nuevos diseños de instrumentos modificaron la punta, el plano radial, el ángulo transversal, el ángulo de corte y en algunos sistemas el vástago.

Otro avance importante fue la creación de nuevos instrumentos para la rectificación inicial del conducto radicular ya que todos los sistemas rotatorios de níquel-titanio presentan un instrumento más corto y de mayor calibre para preparar el tercio coronario del conducto. La marcada conicidad que posee produce una preparación más divergente en la entrada de los conductos radiculares, creando así un acceso más directo a la porción apical que permite una mejor penetración de las soluciones de irrigación y una reducción en las posibilidades de transportación del

foramen.

La complejidad de la anatomía del conducto radicular es causa frecuente de dificultades en la instrumentación. Las posibilidades de obtener una adecuada conformación del conducto es una de ellas, en especial en el sector apical del conducto, donde no siempre es posible correlacionar su diámetro mayor con el calibre de los instrumentos, más aún si el conducto es curvo. Por otra parte, las formas ovaladas y achatadas, que son típicas de ciertos conductos, pueden persistir en todos los niveles de la raíz, aún en el apical, y en todas las edades, lo que sin duda es un verdadero impedimento para lograr una correcta preparación del conducto (Gani y Visvisián 1999).

El tercio apical del conducto radicular es, a menudo, un sector de difícil acceso y en consecuencia, de difícil conformación, no sólo por sus frecuentes curvaturas –no siempre identificables y por lo tanto causantes de deformaciones-, sino también, por su forma, amplitud y presencia de istmos. Tronstad (1993) sostiene que todos los conductos deberían instrumentarse como si fueran curvos. La utilización de instrumentos de níquel titanio, especialmente diseñadas para la conformación apical del conducto radicular constituye una herramienta valiosa para evitar la transportación apical.

### **Sistema ProTaper Universal**

En el año 2001, apareció la segunda generación de instrumentos de níquel-titanio, el sistema ProTaper (Dentsply-Maillefer Ballaigues, Suiza), constituyendo uno de los sistemas rotatorios de níquel-titanio más utilizado mundialmente por su simplicidad y efectividad en la conformación de los conductos radiculares. En el 2006, apareció una nueva serie de instrumentos ProTaper Universal, con bordes cortantes activos y diferentes conicidades en un mismo instrumento.

El sistema se compone de 6 instrumentos designados como Sx (dorado), S1 (violeta), S2 (blanco), F1 (amarillo), F2 (rojo), F3 (azul); y además se presentan dos instrumentos de mayor calibre F4 (negro) y F5 (amarillo). Se comercializan en longitudes de 21 y 25 mm y presentan las siguientes características: conicidad múltiple y progresiva, punta activa no agresiva y hojas cortantes sin radial land. Su sección transversal es triángulo-convexa en los instrumentos Sx, S1, S2, F1 y F2 y triángulo-cóncava en los instrumentos F3, F4 y F5.

La conicidad múltiple significa que un mismo instrumento posee varias conicidades en su longitud, lo cual reduce el área de contacto con la pared dentinaria y permite que cada instrumento haga su propia preparación corono-apical. La punta activa no agresiva posee un ángulo de 60° y un 25% de su superficie es plana, lo que

genera una guía de penetración que disminuye el riesgo de transportación. Las hojas cortantes le confieren mayor efectividad sobre la pared dentinaria. La sección triángulo-convexa evita el enroscamiento y aumenta la resistencia del instrumento a la fractura, debido a su mayor masa metálica. Los instrumentos de mayor calibre presentan concavidad para otorgarle mayor flexibilidad, reduciendo la masa metálica.

Las limas Sx, S1 y S2 conforman el tercio coronario y medio del conducto; mientras que las F1, F2, F3, F4 y F5 son usadas para el tercio apical del mismo. La técnica utilizada con las limas ProTaper es la corono-apical, con una velocidad de rotación del micromotor de 300 rpm. Es una técnica relativamente simple y generalmente son necesarios pocos instrumentos (Goldberg 2001). La mayoría de los conductos se pueden preparar con 4 instrumentos (Sx + S1 + S2 + F1). Con el S1 y el Sx se realiza la preparación de los tercios coronarios y medio del conducto. El calibre del instrumento Sx en D<sub>0</sub> es # 19 y en D<sub>9</sub> corresponde al de una fresa de Gates-Glidden # 4; pero comparativamente con el Sx se obtiene una preparación de los accesos más centrada y cónica. Luego de obtener la longitud de trabajo con una lima manual convencional se procede a la preparación del conducto radicular hasta el límite apical con los instrumentos S1 (# 18 en D<sub>0</sub>), S2 (# 20 en D<sub>0</sub>) y F1 (# 20 en D<sub>0</sub>). En conductos radiculares de mayor amplitud se puede emplear el instrumento F2 (# 25 en D<sub>0</sub>), F3 (# 30 en D<sub>0</sub>); y en los conductos de mayor calibre las limas F4 (# 40 en D<sub>0</sub>) y F5 (# 50 en D<sub>0</sub>). Las limas "S" (shaping) son utilizadas con un movimiento de cepillado, lo cual permite desplazar el instrumento en sentido mesio-distal, mejorando la instrumentación en los conductos ovalados y achatados.

Este sistema además, se presenta con conos de gutapercha de igual calibre que los instrumentos, facilitando la obturación endodóntica.

### **Irrigación de los conductos radiculares**

La sola instrumentación, ya sea por medio de sistemas mecanizados, instrumentos manuales o la combinación de ambos; resulta insuficiente para la limpieza y desinfección del conducto radicular (Hockett y col 2008). Para aumentar la eficacia de la preparación mecánica y la eliminación de bacterias, la instrumentación se complementa con soluciones de irrigación activas. La irrigación se define como el lavado de una cavidad o herida corporal con agua o un líquido medicamentoso. Es necesario el uso de soluciones de irrigación para eliminar del conducto, no sólo los microorganismos, sino también restos orgánicos y limallas dentinarias.

Los objetivos de la **irrigación** son:

- Eliminar residuos del conducto radicular
- Eliminar el barro dentinario adherido a las paredes dentinarias



- Disolver el tejido orgánico del conducto radicular
- Ejercer una acción antimicrobiana
- Lubricar el conducto, facilitando la acción de los instrumentos

La eficacia de la irrigación del conducto radicular depende de varios factores, entre ellos, el tamaño del conducto radicular, el diámetro interno y externo de la aguja, la profundidad de penetración de la misma, el tipo y orientación del bisel de la aguja, la viscosidad del irrigante, la presión de irrigación y volumen de la solución (Hulsmann 2005).

Para tal fin existen en el mercado una gran variedad de **irrigantes endodónticos**, pero los más comúnmente usados pueden clasificarse en compuestos halogenados, tensoactivos, quelantes, ácidos, peróxidos y asociaciones.

#### **Compuestos Halogenados:**

- Soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) en diferentes concentraciones de cloro activo, desde NaOCl al 0,5% hasta NaOCl al 6%
- Solución de Milton: NaOCl al 1% con 16% de cloruro de sodio
- Solución de Dakin: NaOCl al 0,5% con ácido bórico para reducir el pH
- Solución de Dausfrene: NaOCl al 0,5% con bicarbonato de sodio para reducir el pH
- Clorexidina.

#### **Compuestos Tensoactivos:**

- Tensoactivos Aniónicos
  - Texapon: Lauril sulfato de sodio
  - Tergentol: Lauril dietileno glicol éter sulfato de sodio
- Tensoactivos Catiónicos
  - Cetavlon: Bromuro de cetiltrimetilamonio
  - Dehyquart A: Cloruro de cetiltrimetilamonio
  - Biosept: Cloruro cetil piridino
  - Zefirol: Cloruro de benzalconio
- Tensoactivos neutros
  - Tween 80

#### **Quelantes:**

- EDTA: Ácido etilendiamino tetracético
- EDTA-C: Ácido etilendiamino tetracético + Cetavlon
- Salvizol: Tensoactivo quelante

**Ácidos:**

- Ácido cítrico

**Peróxidos:**

- Peróxido de hidrógeno
- Peróxido de urea

**Asociaciones:**

- BioPure MTAD
- Tetraclean
- QMix

**Hipoclorito de Sodio (NaOCl)**

Dentro de los compuestos halogenados, llamados así por poseer elementos químicos en sus moléculas que pertenecen al grupo de los halógenos de la tabla periódica, se encuentra el cloro. En 1820, Labarraque, químico francés obtuvo el NaOCl con 2,5% de cloro activo y esa solución pasó a ser utilizada como antiséptico para heridas. En 1915, Dakin, químico americano, durante la Primera Guerra Mundial, propuso una nueva solución de NaOCl al 0,5 %, neutralizado con ácido bórico al 0,4%, para bajar el pH de 11 a un pH próximo al neutro. De esa manera, se logró la desinfección de las heridas sin el efecto indeseable de la acción de los hidroxilos sobre los tejidos vivos. Dakin (1915) comparó su solución de NaOCl al 0,5% con la de Labarraque al 2,5% y observó que con ambas se obtenía el mismo resultado antiséptico sobre la herida, pero la cicatrización era lenta, debido al gran tenor de hidróxido de sodio, independientemente de su concentración. Con la adición de ácido bórico se forma el borato de sodio en la solución, evitando de esta manera los hidroxilos libres, responsables de la irritación de los tejidos.

La solución de NaOCl con pH elevado, alrededor de 11 a 12, es más estable y la liberación de cloro es más lenta. Al reducir el pH, se vuelve más inestable y la pérdida de cloro es más rápida, como así también ocurre bajo la luz solar y en temperaturas elevadas. Pécora y col. (1986) estudiaron el tiempo de vida de la solución de Dakin almacenada en vidrio ámbar en diferentes condiciones de temperatura. A los 4 meses observaron que la solución perdía un 80% su tenor de cloro cuando estaba expuesta a la luz solar, un 60% a la temperatura ambiente y solamente un 20% cuando fue conservada en la heladera. Además, verificaron que apenas un 30% de las marcas comerciales presentaban cloro activo superior al 0,4%.

Las soluciones de NaOCl tuvieron siempre buena aceptación como irrigante endodóntico. Walker en 1936 presentó su técnica de irrigación que consistía en el uso de NaOCl al 5% como solución auxiliar de la instrumentación. En 1943, Grossman propuso una técnica de irrigación basada en el uso alternado de NaOCl al 5% con Peróxido de hidrógeno al 3% de 10 volúmenes. En esta técnica, la irrigación comienza y termina con NaOCl con la finalidad de evitar la liberación tardía de oxígeno naciente. La reacción química entre ambas soluciones libera oxígeno, es efervescente y exotérmica (Costa 2001). El oxígeno naciente generado dentro del conducto presenta una importante acción antiséptica frente a microorganismos anaerobios.

El NaOCl es en la actualidad el irrigante más utilizado en endodoncia, por sus propiedades antimicrobiana, lubricante, blanqueante, desodorizante, pero fundamentalmente, por su capacidad de disolver la materia orgánica (Azüero y Herrera 2003). Esta última propiedad fue motivo de estudio de diversos autores (Senia 1971, Hands y col 1978, Cunningham y Balakejan 1980, Abou-Rass y col 1981). Su poder de disolución de la materia orgánica se incrementa progresivamente a medida que aumenta su concentración (Clarkson y col 2006). Estos hallazgos ya habían sido descritos por Sanó (2001), quien estudió la capacidad solvente del NaOCl en diferentes concentraciones desde 0,5% a 5%, sobre pulpas bovinas y observó que cuanto mayor es su concentración, mayor será su capacidad solvente. Además, observó que al aumentar la temperatura aumenta proporcionalmente su capacidad solvente.

Por otro lado, dentro del amplio espectro de sus propiedades biológicas, el NaOCl ha demostrado ejercer una acción antimicrobiana eficiente (Bistró y Sundqvist 1983), es antifungal y germicida (San y col 1999; Mc Donell y Russell 1999). Su actividad solvente y propiedades antimicrobianas, según Ohara y Torabinejad (1993) se deben a la oxidación e hidrólisis de las proteínas celulares, la liberación de cloro para formar ácido hipocloroso y la extracción por ósmosis de líquidos fuera de las células. La reacción química entre el tejido orgánico y el NaOCl se basa fundamentalmente en la formación de hidróxido de sodio y ácido hipocloroso:

- El hidróxido de sodio es un potente solvente orgánico y de grasas, formando jabones, por el mecanismo de saponificación
- El ácido hipocloroso libera cloro naciente que se combina con el grupo amina de las proteínas, formando las cloraminas.

El poder solvente dependerá de la cantidad de materia orgánica e NaOCl presente, de la concentración de la solución, de la superficie de contacto entre el tejido y la solución, y la frecuencia de la irrigación. En consecuencia, la irrigación deberá ser

abundante, renovando la solución con frecuencia, para obtener el máximo efecto del NaOCl.

El NaOCl posee baja tensión superficial, lo cual favorece su penetración a zonas de difícil acceso y su pH es muy alcalino (11.5 a 11.7), por lo que neutraliza la acidez del medio y dificulta, de esta manera, el desarrollo bacteriano. Estrela y col (1995) sostienen que la actividad antibacteriana se produce por un mecanismo similar al del hidróxido de calcio, basado fundamentalmente en su pH elevado, producido por la acción de los iones hidroxilos, que actúan sobre la membrana plasmática de la bacteria, alterando su integridad e inhibiendo la actividad enzimática y su metabolismo celular.

La concentración de la solución de NaOCl considerada como la más apropiada ha sido motivo de discusión desde hace ya muchos años. Dada la amplitud del espectro de acción de las diferentes concentraciones sugeridas, parecería más aceptable establecer un balance entre la eficacia para destruir los microorganismos y la tolerancia biológica de los tejidos (Bloomfield y Miles 1978; Fraix y col 2001). Esto significa, que cada operador puede seleccionar la concentración de su preferencia, teniendo en cuenta no solamente la capacidad antibacteriana, sino también la toxicidad demostrada por las concentraciones más altas (Spangberg y col 1973; Harrison y col 1978); ya que a mayor concentración, la solución es más efectiva en menor período de tiempo, pero presenta mayor citotoxicidad. El NaOCl es usado en diferentes concentraciones que varían de 0,5% a 5,25%, y se ha demostrado que posee acción antimicrobiana sobre bacterias, hongos, esporas y virus.

Peciulene y col (2001) en un estudio *in vivo*, evaluaron la instrumentación e irrigación con NaOCl en dientes con periodontitis periapical, y demostraron que *E. faecalis* fue más resistente al NaOCl, respecto a *Candida albicans* y a bacilos Gram-. En otro estudio *in vitro*, Waltimo y col (1999) demostraron que el NaOCl en un rango de 0,5% al 5% inhibió a *Candida albicans* en 30 segundos, mientras que en concentraciones menores (0,05% y 0,005%) requirió más de 24 horas. Asimismo, sobre *E. faecalis*, Gomes y col (2001) encontraron que la solución al 5,25% fue efectiva en 30 segundos, mientras que al 2,5% y 0,5% requirió 10 y 30 minutos para completar la muerte celular. Vianna y col (2004) observaron que *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* y *Prevotella intermedia* mostraron alta susceptibilidad al NaOCl al 5,25% a los 15 segundos.

Por su parte, Ohara y col (1993) demostraron que las mayores diluciones de NaOCl pierden rápidamente su efecto antibacteriano. Siqueira y col (1998) compararon *in vitro*, la acción del NaOCl al 4% y 2,5% con diferentes soluciones irrigantes como digluconato de clorhexidina al 0,2 y 2,0%, ácido cítrico al 10% y EDTA

al 17%; frente a cultivos de bacterias anaeróbicas y/o bacterias facultativas, como *E. faecalis*, mediante un ensayo de difusión en agar; y demostraron que no hubo diferencias significativas entre los grupos. En un estudio posterior, demostraron que reduciendo la concentración de la solución hasta el 1%, los resultados fueron similares (Siqueira y col 2000).

Sin embargo, el NaOCl resulta sumamente tóxico cuando se lo utiliza en altas concentraciones y esto constituye un serio inconveniente en la clínica diaria. Con respecto a la citotoxicidad, Bystrom y Sundqvist (1983) observaron que NaOCl al 0,5% posee baja toxicidad; pero a tan baja concentración, el NaOCl necesita 30 minutos para inhibir el desarrollo de microorganismos facultativos. En otro estudio antimicrobiano, *in vivo*, los mismos autores (1985) demostraron que no hubo diferencias significativas entre diferentes concentraciones de NaOCl al 1%; 2,5% y 5%, en cuanto a su efecto antimicrobiano sobre una flora anaerobia mixta del conducto radicular.

Considerando que durante el tratamiento endodóntico sólo se accede al conducto principal, gran parte del sistema de conductos no es instrumentado; por lo que se considera importante el uso del NaOCl por la transformación de sustancias insolubles como son el tejido pulpar y restos necróticos de zonas inaccesibles, en sustancias solubles como jabones, cloraminas y sales de aminoácidos en suspensión. Pero además, la acción de los instrumentos sobre las paredes dentinarias, conjuntamente con la solución de irrigación, a la vez que conforman y eliminan los restos de tejido del conducto principal; producen barro dentinario, obstruyendo la entrada de los túbulos dentinarios y conductos laterales (Mader y col 1984, Torabinejad y col 2002). El barro dentinario resultante contiene microorganismos, restos orgánicos de pulpa vital y/o necróticos y restos inorgánicos de limallas dentinarias generadas durante la instrumentación; por lo cual resultaría necesario usar soluciones de irrigación que sean efectivas frente a los microorganismos, pero que a la vez sean capaces no sólo de disolver la materia orgánica sino también el componente inorgánico.

El barro dentinario actuaría como una barrera para la penetración de los agentes antibacterianos y selladores endodónticos dentro de los túbulos dentinarios; comprometiendo el sellado de la interfase material de obturación /pared dentinaria.

Tal como fue mencionado por Oyarzun y col (2002), por su alto poder de disolución, el NaOCl por sí solo puede remover la fase orgánica del barro dentinario y gran parte de las bacterias contenidas en él, pero necesita del componente de otros irrigantes para la remoción de la fase inorgánica de éste. En una experiencia piloto realizada por Zmener y col (2007), se comprobó por medio del microscopio electrónico

de barrido que, luego de la preparación biomecánica, el uso exclusivo de NaOCl al 5,25% no fue efectivo para eliminar la fase inorgánica del barro dentinario en conductos radiculares previamente infectados con un inóculo polibacteriano. El componente inorgánico remanente reveló la persistencia de bacterias que no fueron eliminadas por el NaOCl durante la remoción de la fase orgánica del barro.

El NaOCl por sí solo no remueve el barro dentinario, ya que sólo actúa sobre la materia orgánica de la pulpa y preentina (Beltz y Torabinejad 2003). El uso de NaOCl en combinación con otras soluciones quelantes, como complemento de la acción de los instrumentos endodónticos se ha constituido en un procedimiento de elección (Siqueira y col 2000, Zehnder y col 2006). En ese sentido, Baumgartner y Mader (1987) demostraron que el barro dentinario podría ser totalmente eliminado mediante el uso alternado de una solución de EDTA 15% e NaOCl al 5,25%.

### **Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)**

En los últimos años, el uso de la sal disódica de ácido etilendiamino tetracético (EDTA), ha despertado gran interés por su propiedad quelante, ya que remueve el componente inorgánico de la dentina, facilitando la limpieza y remoción de tejido infectado. El EDTA es utilizado en una solución al 17% y posee un pH 7. Presenta poca actividad antibacteriana, pero en exposición directa por largo tiempo, tiene la capacidad de extraer las proteínas de la superficie bacteriana por combinación de iones metales de la cubierta celular, que eventualmente induciría a la muerte celular. El cetavlon es adicionado en las soluciones de EDTA-C con la finalidad de reducir el potencial hidrogeniónico, disminuyendo el pH.

Hace años, el EDTA era considerado sólo como ensanchador químico para la instrumentación de conductos estrechos. Orstavick y Haapasalo (1990) demostraron que la remoción del barro dentinario con EDTA mejora el efecto antibacteriano de agentes desinfectantes locales en capas profundas de la dentina. Goldberg y col (1977, 2010) observaron que el EDTA, al actuar sobre la porción inorgánica del barro dentinario, conjuntamente con NaOCl, lo remueve de las paredes dentinarias, eliminando de esta manera los microorganismos presentes en él.

Aún no se ha desarrollado un irrigante capaz de disolver el tejido orgánico, y a su vez, desmineralizar el tejido calcificado, por lo cual, es necesario combinar ambas soluciones, como por ejemplo, EDTA e NaOCl. La irrigación final con EDTA, seguida de la acción neutralizante del NaOCl, se convierte en una mezcla sinérgica que disminuye la tensión superficial, permitiendo la difusión del NaOCl para que actúe sobre los microorganismos (Azuero 2003). El uso alternado de NaOCl, EDTA y luego NaOCl como irrigación final resulta una secuencia efectiva para eliminar el barro

dentinario, y por consecuencia los microorganismos adheridos a la pared dentinaria; ya que el EDTA, por sus propiedades quelantes secuestra el calcio de la dentina intertubular, dejando expuesto el colágeno que luego va a ser desnaturalizado por la acción proteolítica del NaOCl.

Soares y col (2010) analizaron la efectividad de la preparación químico-mecánica con el uso alternado de NaOCl y EDTA para eliminar el biofilm de *E. faecalis* dentro del conducto y observaron que el uso alternado de NaOCl al 5,25% con EDTA al 17% fue más efectivo que cuando se usó sólo EDTA en la irrigación final.

En otro estudio, Qian y col (2011) observaron que el uso de NaOCl como irrigante final, luego del uso de agentes desmineralizantes como EDTA, EGTA o ácido cítrico, produce una marcada erosión de la dentina peritubular e intertubular del conducto radicular. Asimismo, Mai y col (2010) también observaron erosión dentinaria debido al prolongado uso del NaOCl al 5,25 durante 60 minutos, antes de usar EDTA para la irrigación final.

Por su parte, con el objeto de eliminar el efecto inhibitorio del oxígeno generado a partir del NaOCl sobre los materiales de obturación a base de metacrilato, Doyle y col (2006), Nagas y col (2007) aconsejan utilizar EDTA seguido por suero fisiológico como paso final del protocolo de irrigación. Esto permitiría eliminar de la pared dentinaria todo resto de NaOCl que pueda alterar el proceso de polimerización del material de obturación.

Hasta el momento no se conoce otra solución de irrigación usada en endodoncia que posea la propiedad de disolver el tejido orgánico como el NaOCl, por tal motivo no ha sido reemplazada por ningún otro irrigante, durante la instrumentación. Pero, teniendo en cuenta que su uso, luego del EDTA, en la etapa final de la instrumentación, podría generar erosión dentinaria; debería considerarse la alternativa del uso de agua destilada en los casos de pulpas vitales o alguna solución irrigante con propiedades antimicrobianas en conductos infectados.

### **Solución de yodo yoduro de potasio (IPI)**

La solución de yodo al 2% en yoduro de potasio al 4 % es utilizada como desinfectante endodóntico por sus excelentes propiedades antibacterianas y su baja citotoxicidad. Si bien, es menos reactivo que el cloro; bacterias, hongos, virus y esporas son sensibles a este compuesto. Las soluciones acuosas de yodo son inestables, por lo cual se han desarrollado los iodóforos, como la iodopovidona, constituyendo complejos de yodo y un agente solubilizante, el cual actúa como reservorio del yodo activo libre (Gottardi 1991). Estos compuestos mantienen una actividad germicida, pero son menos activos frente a hongos y esporas que las tinturas

alcohólicas de yodo.

La acción antimicrobiana del yodo es rápida, aún a bajas concentraciones. El yodo penetra en el interior de los microorganismos y ataca grupos de moléculas celulares tales como proteínas, nucleóticos y ácidos grasos, provocando la muerte celular (Gottardi 1991, Chang 1971).

Möller (1966) usaron el compuesto de yodo yoduro de potasio (IPI 2% de yodo, 4% de yoduro de potasio y 94 % de agua destilada) como desinfectante de la superficie del diente. Molander y col (1999), en un estudio *in vivo*, en dientes con periodontitis periapicales crónicas, irrigaron el conducto radicular con IPI al 5%, antes de su obturación con hidróxido de calcio, y observaron que si bien la irrigación con IPI no aumentaba cuantitativamente el poder antimicrobiano, redujo la frecuencia de cadenas persistentes de *E. faecalis*.

En otro estudio *in vivo*, Peciuliene y col (2001), sobre 20 dientes que presentaban fracasos en el tratamiento endodóntico, tomaron muestras bacterianas antes de comenzar el retratamiento y luego de la instrumentación e irrigación, detectando que sólo 5 dientes mantuvieron crecimiento bacteriano positivo; pero luego de 5 minutos de irrigación con IPI, sólo un conducto reveló crecimiento bacteriano. Por su parte, Spratt y col (2001) cultivaron biofilms de *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum* y *Enterococcus faecalis*, en presencia de plata coloidal (5ppm), NaOCl al 2,5%, clorhexidina al 0,2%, yodo al 10% y suero fisiológico como control.

Waltimo y col (1999) analizaron la acción de diferentes desinfectantes, NaOCl al 0,5% y 5%, yoduro de potasio al 4%, acetato de clorhexidina al 0,5% e hidróxido de calcio; frente a siete cepas de *Candida albicans*. Los resultados demostraron que tanto el NaOCl, en ambas concentraciones; como el yoduro de potasio al 4% fueron sumamente efectivos frente al hongo en pocos segundos. El acetato de clorhexidina al 0,5% requirió varios minutos para ser efectivo, mientras que el hongo fue resistente a la acción del hidróxido de calcio.

En otro estudio realizado por Wang y col (2012) observaron que IPI al 2/4 % fue tan efectivo como NaOCl al 2% y Clorexidina al 2% frente *E. faecalis* en los túbulos dentinarios.

Pero las desventajas que presenta el yodo son su potencial alergénico (Propescu y col 1984) y por su color amarronado, podría pigmentar la dentina (Schafer y col 2007)



## BioPure MTAD

En los últimos años han surgido dos nuevos irrigantes: MTAD (Torabinejad y col 2003) y Tetraclean (Giardino y col 2005), basados en una asociación de un antibiótico (Doxiciclina), ácido cítrico y un detergente, Tween 80 para MTAD y polipropilenglicol para Tetraclean. Si bien, en ambas soluciones, el antibiótico es un derivado de la tetraciclina, su concentración es menor en Tetraclean, siendo de 50 mg/5 ml, mientras que en el BioPure MTAD es de 150 mg/5 ml. Esta composición pretende un efecto antimicrobiano a través de la Doxyciclina, la remoción del barro dentinario a través del ácido cítrico y bajar la tensión superficial de la solución, mediante un detergente. En un estudio, donde se comparó la tensión superficial de algunos irrigantes, se observó que Tetraclean presentó el menor valor de tensión superficial; con lo cual permitiría un mayor contacto de la solución con las paredes dentinarias (Giardino y col 2006).

Torabinejad y col (2003) investigaron el efecto de varias concentraciones de NaOCl como irrigante en el conducto antes de la irrigación final con BioPure MTAD (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza), demostrando que no existieron diferencias significativas en la habilidad del NaOCl al 1,3%; 2,6% y 5,2% y del BioPure MTAD para remover el barro dentinario. Todas las combinaciones estudiadas eliminaron el barro dentinario, como así también, los remanentes orgánicos.

Por su parte, Beltz y col (2003), observaron que el BioPure MTAD no afecta el tejido orgánico pulpar, pues sólo actúa sobre el componente inorgánico de la pared dentinaria.

Con respecto a la citotoxicidad sobre fibroblastos, el BioPure MTAD es menos citotóxico que el eugenol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, pasta de Ca(OH)<sub>2</sub>, NaOCl al 5,25%, Peridex, EDTA; y más citotóxico que el NaOCl al 2,63%, 1,31% y 0,66% (Zhang y Torabinejad 2003).

El interés del BioPure MTAD radica en su acción antibacteriana porque contiene tetraciclina. Torabinejad y col. (2003) en un estudio *in vitro*, compararon el efecto antibacteriano del BioPure MTAD e NaOCl y EDTA sobre *E. faecalis*. Los resultados mostraron que el BioPure MTAD es tan eficaz como NaOCl al 5.25%, siendo mayor su efecto que el EDTA y el NaOCl en concentraciones más bajas.

Por su parte, Dunavant y col (2006) estudiaron la capacidad antibacteriana de NaOCl al 1% y 6%, clorhexidina al 2,0%, REDTA, Smear Clear (SybronEndo, Orange, CA, USA) y BioPure MTAD sobre biofilms de *E. faecalis* durante 1 y 5 minutos. Los resultados demostraron que el NaOCl al 1% y 6% fueron más efectivos para eliminar el biofilm bacteriano que los demás agentes ensayados.

En otra experiencia, Ruff y col (2006) compararon la actividad antifungal de una

solución de NaOCl al 6% con EDTA al 17% y Biopure MTAD. Los resultados demostraron que NaOCl fue significativamente más efectivo que BioPure MTAD.

Adiguzel y col (2011), en un estudio *in vitro*, también usaron EDTA y BioPure MTAD como irrigación final, luego de usar NaOCl al 1,3% durante la instrumentación de los conductos con el Sistema Safety-adaptive file (SAF), con el objetivo de estudiar la limpieza de los conductos radiculares. Ellos observaron que el uso de MTAD y EDTA aumentó significativamente la remoción del barro dentinario, comparado con el grupo donde no se usó irrigación final.

Asimismo, Dai y col (2011) también estudiaron el uso de EDTA al 17%, BioPure MTAD y QMix como irrigación final de los conductos radiculares, luego de usar NaOCl al 5,25% durante la irrigación inicial; observando que QMix fue tan efectivo como EDTA para la remoción del barro dentinario.

### **Diseños de trabajos de investigación *in vitro***

Los diseños de trabajos de investigación *in vitro*, sobre el efecto antimicrobiano de los irrigantes requieren de una adecuada metodología de infección que asegure el desarrollo bacteriano en el diente para evitar falsos resultados en posteriores observaciones. Las bacterias que colonizan el sistema del conducto radicular, *in vivo*, se desarrollan como células plantónicas suspendidas en la fase líquida del mismo, pero además se unen a la superficie en un biofilm mixto, formado por células con distintas morfologías o agregados simples de una misma morfología, adherido a las paredes de dentina (Molven y col 1991).

Los conductos laterales y los istmos pueden estar obstruídos por células bacterianas organizadas principalmente en biofilm (Ricucci y col 2008). Es frecuente observar cómo las bacterias penetran en los túbulos dentinarios, ya que el diámetro de dichos túbulos es lo suficientemente grande para permitir la penetración de la mayoría de los microorganismos de la cavidad oral. Se ha descrito que la infección de los túbulos dentinarios se produce en el 70-80 % de dientes con lesión periapical (Peters y col 2001). La penetración superficial es más frecuente, aunque en algunos casos se observa que las bacterias alcanzan los 300 micrómetros.

Siqueira y col (2002) observaron células en división dentro de los túbulos dentinarios, lo que indicaría que las bacterias pueden obtener sus nutrientes procedentes de la degradación de los procesos odontoblásticos, colágeno desnaturalizado, bacterias que mueren durante la infección y los líquidos presentes en el interior del conducto, que penetran en los túbulos por capilaridad.

Waltimo y col (1999) demostraron *in vitro*, la penetración de patógenos endodónticos en los túbulos dentinarios, como *Porphyromonas endodontalis*,

*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actynomices israelii*, *Propionibacterium acnés*, *E. faecalis*, *Candida albicans* y *Streptococos*.

Si bien es difícil reproducir *in vitro* la infección de un conducto *in vivo*, a partir del modelo de infección de bloques dentinarios bovinos, presentado por Haapasalo y Orstavik (1987), en el que previo a infectarlos aplicaron NaOCl al 5,25% seguido de EDTA al 17%, numerosos autores comenzaron a utilizar ambas sustancias para eliminar el barro dentinario antes de inocular la bacteria, facilitando la penetración de las bacterias en los túbulos dentinarios. Por otra parte, Siqueira y col (2010) antes de infectar los conductos con *E. faecalis*, utilizaron además, Tiosulfato de sodio al 10% para inactivar la acción residual del NaOCl.

Otro aspecto importante a considerar en los estudios *in vitro*, donde se utilizan dientes extraídos, es la edad del paciente. Se han demostrado algunos cambios en el complejo dentino-pulpar como la esclerosis tubular, que ocurre como resultado de un incremento de la dentina peritubular (Ketterl y col 1983). Los túbulos dentinarios se obliteran, observándose un estrechamiento de aproximadamente 2,5 micrómetros de diámetro cerca de la pulpa y 0,9 micrómetros cerca del esmalte/cemento. Rigden y col (2008) observaron que el diámetro promedio de una célula de *E. faecalis* es de aproximadamente 0,8 a 1 micrómetro de diámetro, resultando menor que el tamaño de los túbulos dentinarios.

Los estudios realizados *in vitro*, sobre dientes humanos extraídos, generalmente no consideran la edad del paciente como una variable importante; probablemente por la dificultad en la recolección de los dientes. Sin embargo, la edad estaría directamente relacionada con la amplitud de los túbulos dentinarios.

Recientemente, Ozdemir y col (2010) estudiaron *in vitro* el efecto del EDTA e NaOCl sobre *E. faecalis* en la dentina de conductos radiculares humanos jóvenes, menores de 30 años, y mayores de 60 años; observando que si bien las diferencias no fueron significativas, en el grupo adulto el recuento de bacterias residuales en el conducto, luego de la irrigación, fue mayor que en el grupo joven, con lo cual se podría inferir que los conductos radiculares de adultos mayores son más susceptibles de infecciones endodónticas.

Estudios recientes demostraron que el colágeno, que forma la matriz orgánica de la dentina, jugaría un papel importante en la capacidad de adhesión de *E. faecalis* a la superficie dentinaria (Love y col 2002, Kowalski y col 2006), lo cual podría tener alguna incidencia tanto en la penetración de las bacterias en los túbulos dentinarios, en la etapa inicial de infección *in vitro*; como en la difusión de los irrigantes en la etapa final de la irrigación.

Por otro lado, siguiendo con el análisis de la metodología de estudios

microbiológicos, la mayoría de los trabajos de investigación estudian el efecto antibacteriano de los irrigantes inmediatamente después de la instrumentación e irrigación; aún cuando se ha demostrado que con ningún irrigante se logra eliminar totalmente las bacterias del conducto y dentina radicular, los mismos podrían reinfestar el conducto a distancia.

Baca y col (2011) estudiaron el efecto residual de diferentes regímenes de irrigación en conductos infectados con *E. faecalis*, recolectando las muestras a los 60 días luego de la preparación quimiomecánica y una irrigación final con EDTA al 17% o ácido maleico al 7% seguidos de NaOCl al 5,25% o clorhexidina al 2% y cetramida al 0,2%. Si bien las diferencias no fueron significativas, la combinación de clorhexidina al 2% con cetramida al 0,2% sería una alternativa efectiva como irrigación final por su acción antimicrobiana residual a los 60 días, observando que con NaOCl al 5%, los cultivos fueron negativos inmediatamente, resultando positivos al 5<sup>to</sup> día. En la reinfestación del conducto, no sólo es importante el número de bacterias residuales sino también su virulencia, el aporte de nutrientes, el efecto residual de la irrigación final; y en situaciones clínicas, la calidad de la obturación del conducto radicular.

Presumiendo que las soluciones irrigantes no neutralizan totalmente la presencia de las bacterias en el conducto radicular, en este caso *E. faecalis*, y que los microorganismos pueden quedar en los túbulos dentinarios y provocar una reinfestación del conducto, si no es obturado inmediatamente en forma correcta; nos propusimos estudiar el efecto antimicrobiano de distintos protocolos de irrigación, mediante controles bacteriológicos inmediatos y mediatos.

## **HIPÓTESIS**

La irrigación final del conducto radicular con una solución antibacteriana elimina totalmente las bacterias del conducto, tanto en dientes de pacientes jóvenes como adultos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antibacteriano de diferentes soluciones irrigantes, asociadas a una técnica de instrumentación mecanizada, sobre *E. faecalis* en el conducto radicular, teniendo en cuenta la edad del diente.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar en conductos radiculares de dientes humanos extraídos, un método de infección *in vitro* con *E. faecalis*.
- Estudiar la viabilidad de *E. faecalis* en la luz del conducto radicular, inmediatamente después de instrumentado e irrigado con diferentes soluciones antisépticas.
- Establecer un control bacteriológico a distancia del conducto radicular luego de ser instrumentado e irrigado.
- Observar si la edad influye sobre la infección, desinfección y reinfección a distancia del conducto radicular.
- Evaluar si existen diferencias entre dos grupos etarios en lo que respecta a la permeabilidad dentinaria a *E. faecalis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de estudiar el efecto de distintos agentes irrigantes de uso endodóntico, en conductos previamente infectados con *E. faecalis*, se utilizaron 106 piezas dentarias extraídas, distribuidas en dos grandes grupos (88 premolares y 18 caninos), para ser utilizadas en los siguientes estudios:

**Estudio 1.- evaluación del efecto inmediato y a distancia de distintos irrigantes de uso endodóntico, en dientes de edades conocidas, infectados con *E. faecalis*.**

**Estudio 2: evaluación de la permeabilidad de la dentina a *E. faecalis*, en dientes de edades conocidas.**

### **ESTUDIO 1.- EFECTO INMEDIATO Y A DISTANCIA DE DISTINTOS IRRIGANTES DE USO ENDODÓNTICO, EN DIENTES DE EDADES CONOCIDAS, INFECTADOS CON *E. faecalis*.**

Se utilizó el grupo compuesto por 88 premolares (superiores e inferiores) de edades conocidas, extraídos por diversos motivos, particularmente por indicaciones ortodónticas y protéticas, por posición anómala y destrucción coronaria.

Inmediatamente de extraídas, las piezas dentarias fueron lavadas e identificadas según la edad, las cuales se mantuvieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0,01%, hasta el momento de ser sometidas a una prolija limpieza de todo tipo de adherencias.

La segunda selección se efectuó sobre los dientes *ex situs*, en base a un estudio radiográfico, tanto en sentido ortorradial como próximo-proximal, a los efectos de conocer su anatomía interna y descartar los que tuviesen más de una raíz o conducto.

Como criterios de inclusión de las muestras, se consideró, en primer lugar, que se contarán con el consentimiento informado firmado por parte del donante, como así también su edad; que el diente fuera unirradicular y el diagnóstico de pulpa vital; que la raíz estuviera sana, que no hubiese sido afectado por lesiones periodontales graves y que en el examen radiográfico se evidenciara la presencia de un único conducto. Se excluyeron del estudio las piezas que en el estudio radiográfico mostraran un sistema de conductos complejo, que presentara calcificaciones, resorciones o cualquier otra situación atípica o anómala.

Finalizada la selección, y previo a la realización del estudio que describiremos más adelante, los premolares, con su correspondiente identificación, se distribuyeron en los siguientes grupos etarios de 44 muestras cada uno:

**Grupo A.-** compuesto por premolares que provenían de pacientes cuyas edades cubrían un período etario comprendido entre los 14 y 25 años.

**Grupo B.-** compuesto por premolares que provenían de pacientes mayores de 50 años.

Con el fin de conocer el efecto inmediato y a distancia de distintos agentes irrigantes de uso endodóntico, en el **Estudio 1** se realizaron tres experiencias, tal como se describe a continuación:

**1.A.- Infección *in vitro* de los conductos radiculares con *E. faecalis*.**

**1.B.- Evaluación del efecto inmediato de distintos irrigantes de uso endodóntico, en conductos radiculares infectados con *E. faecalis*.**

**1.C.- Evaluación del efecto a distancia de distintos irrigantes de uso endodóntico, en conductos radiculares infectados con *E. faecalis*.**

## **1. A.- INFECCIÓN IN VITRO DE LOS CONDUCTOS RADICULARES CON *E.faecalis*.**

La presente experiencia tuvo como finalidad infectar, con una cepa de *E. faecalis* ATCC 2912, los conductos radiculares de los 88 premolares destinados para el presente estudio. En ella se consideraron dos etapas:

**1A.1.-** Proceso de infección, incubación y desarrollo bacteriano en los conductos.

**1A.2.-** Evaluación de la infección de los conductos a través de Microscopía Electrónica de Barrido.

### **1A.1- Proceso de infección, incubación y desarrollo bacteriano en los conductos.**

Como primer paso se efectuó la apertura cameral en todas las piezas, procediendo del siguiente modo: con piedras de diamante esféricas # 6 (KG Sorensen Ref ISO 806 314 001 524 014) y alta velocidad se removió el esmalte; y con fresas metálicas de dimensiones acorde al caso y baja velocidad, la dentina sana o cariada. Con fresa tronco cónica (KG Sorensen Ref ISO 142 51 1053) y fresa Endo-Z (Dentsply-Maillefer-Ballaigues-Suiza) se completó el abordaje y la rectificación de las paredes de acceso.

Para confirmar la permeabilidad de los conductos radiculares, se realizó cateterismo con limas tipo K #15 (Maillefer-Dentsply-Ballaigues-Suiza) en toda su longitud, irrigando con 5 ml de agua destilada. Con la misma lima se estableció la medida de trabajo, introduciéndola hasta el foramen, para restarle luego 1mm a esa medida.

Previo a la infección de los conductos radiculares con *E. faecalis*, y a los efectos de remover el barro dentinario acumulado, para que no obstaculizara la penetración bacteriana en los túbulos dentinarios, los conductos se irrigaron con 1 ml de NaOCl al 5,25% (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina), seguido de 1 ml de EDTA al 17% (Tedequim SRL, Córdoba, Argentina), y 1 ml de tiosulfato de sodio al 10% (Merck, USA) para inactivar el efecto residual del NaOCl.

Para ello, se utilizaron jeringas descartables de 2,5 ml (BD Plastipak-Becton Dickinson Ltda, Brasil) y aguja calibre 30 (Appli-Vac, Vista Dental; USA). Cada sustancia permaneció en el conducto por un lapso de 5 minutos. Finalmente los conductos se irrigaron con 5 ml de solución fisiológica estéril, se secaron y se colocaron por separado, en frascos de acrílico para ser esterilizados con óxido de etileno (Fig. 1).



**Fig. 1: Dientes esterilizados con óxido de etileno.**

Transcurridos 7 días, los dientes fueron infectados con una cepa de *E. faecalis* ATCC 29212. Los cultivos stock fueron conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  usando glicerol al 15% (v/v) como crioprotector. Los cultivos en serie de *E. faecalis* se realizaron en Agar Tripteína Soya (ATS-Britania Lab, Buenos Aires, Argentina) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 hs. Posteriormente, se diluyó 1 ml de dicho cultivo en 5 ml de Tripteína Soya (TSB, Britania Lab, Buenos Aires, Argentina).

Cada uno de los dientes fue colocado en un tubo eppendorf (Fig. 2) y sus conductos fueron inyectados con 1 ml del inóculo bacteriano, en una concentración de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), utilizando agujas de calibre 30 ga (Appli-Vac, Vista Dental, USA), hasta cubrir el diente con TSB. Los mismos fueron incubados en estufa a  $37^{\circ}$  durante 60 días, con renovaciones periódicas (dos



veces por semana) del medio de cultivo.



Fig. 2. Cada diente colocado en un tubo eppendorf

### 1A.2.-Evaluación de la infección de los conductos con Microscopía Electrónica de Barrido

Transcurrido los 60 días de incubación, se realizó un estudio con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), para corroborar la efectividad del modelo de infección. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente cuatro muestras, de las cuales, dos provenían del **Grupo A** (menores de 25 años) y las otras dos del **Grupo B**, (mayores de 50 años), para ser preparadas de la siguiente manera:

- 1- Se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en solución buffer de fosfato de potasio (PBS pH7.4) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Posteriormente se realizaron 2 lavados con 2 ml de PBS (pH7.4), durante 5 minutos cada uno.
3. Luego, se sumergieron en 1 ml de solución de Osmio al 1% en PBS (pH7.4) a temperatura ambiente, durante 1 hora
4. Finalmente se realizaron 3 lavados con 2 ml de PBS (pH7.4), durante 5 minutos cada uno.

Realizada la fijación, los dientes se seccionaron longitudinalmente para lo cual se tallaron, con un disco de carborundum a baja velocidad, en ambas caras libres de la raíz, 2 ranuras en sentido vestíbulo-lingual que se profundizaron hasta la cercanía del conducto radicular. En una de las ranuras se calzó una hoja de navaja (Gillette), que presentaba un extremo filoso y el otro romo, sobre el cual se aplicó la fuerza de un martillo para separar la raíz en 2 secciones. Cada diente seccionado fue colocado en un tubo eppendorf con PBS.

La preparación final para MEB fue realizada en la Universidad British Columbia, Canadá, por el Dr Wei Qian. La evaluación y obtención de imágenes estuvo a cargo del Prof Dr Markus Haapasalo.

## 1. B.- EVALUACIÓN DEL EFECTO INMEDIATO DE DISTINTOS IRRIGANTES DE USO ENDODÓNTICO, EN CONDUCTOS RADICULARES INFECTADOS CON *E. faecalis*.

Transcurrido el período de incubación, con esmalte para uñas se pintaron los 4 o 5 mm apicales de la raíz, a los fines de evitar que durante la instrumentación e irrigación del conducto, la solución utilizada fluya a través del foramen y foraminas apicales y laterales (Fig. 3).



Fig. 3: Sellado apical con esmalte

En estas condiciones y previo a toda intervención, los premolares se dividieron en 6 (seis) grupos, de 14 dientes cada uno, destinados a experimentar en cada grupo, el efecto antibacteriano que poseen los distintos agentes irrigantes a estudiar, como coadyuvantes de la instrumentación y desinfección. En cada grupo, los dientes se identificaron según el grupo etario (A: menores de 25 años y B: mayores de 50 años).

Los conductos se instrumentaron con el sistema rotatorio ProTaper Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza), utilizando los instrumentos Sx- S1- S2- F1- F2 y F3. (Fig. 4) según las indicaciones del fabricante; aplicando según el grupo y subgrupo, el agente irrigante, tal como se describe a continuación:

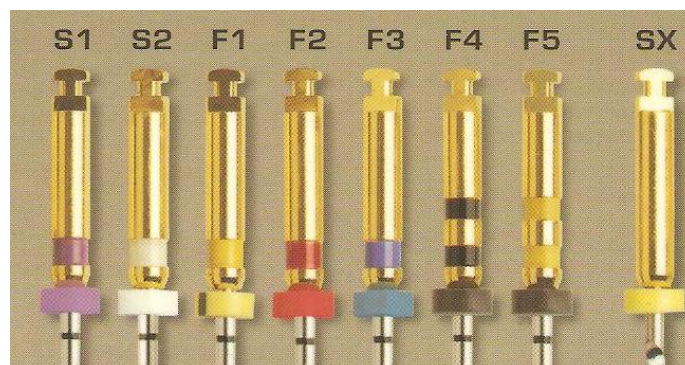


Fig. 4: Sistema ProTaper Universal

- Grupo 1:** NaOCl al 1% + EDTA al 17%
- Grupo 2:** NaOCl al 2,5% + EDTA al 17%
- Grupo 3:** NaOCl al 5,25% + EDTA al 17%
- Grupo 4:** NaOCl al 1% + MTAD (Biopure, Dentsply-Tulsa)
- Grupo 5:** NaOCl al 1% + EDTA al 17% + IPI
- Grupo 6:** NaOCl al 1% + EDTA al 17% + NaOCl al 5,25 %

**Grupo 1:** La irrigación se efectuó con 7 ml NaOCl al 1% durante la instrumentación. Se utilizó 1 ml de la solución antes de iniciar la instrumentación y 1 ml luego de cada instrumento. Finalizada la preparación, los conductos se secaron con conos de papel estériles y se irrigaron con 1 ml de EDTA al 17%, dejándolo actuar en el conducto durante 5 minutos.

**Grupo 2:** Los conductos se irrigaron con NaOCl al 2,5% y EDTA al 17%. El procedimiento fue similar al aplicado en el Subgrupo 1.

**Grupo 3:** Los conductos se irrigaron con NaOCl al 5,25% y EDTA al 17%. El procedimiento fue similar al del Subgrupo 1.

En los Subgrupos 4, 5 y 6 los conductos se irrigaron con 7 ml de NaOCl al 1% durante la instrumentación. Finalizada la misma, se secaron con conos de papel estériles y como irrigante final, en cada subgrupo se utilizó una solución antibacteriana distinta, tal como se detalla a continuación:

**Grupo 4:** Los conductos se irrigaron con 1 ml de Biopure-MTAD (Biopure-Dentsply, Tulsa, USA), y transcurridos 5 minutos, se irrigó con 4 ml de BioPure MTAD. En el presente grupo no se usó EDTA porque Biopure- MTAD contiene ácido cítrico en su composición.

**Grupo 5:** Los conductos se irrigaron con 1 ml de EDTA al 17%, y 5 minutos después, se secaron y se irrigaron con 4 ml de IPI (2% de yodo, 4% de yoduro de potasio y 94% de agua destilada), dejándolo actuar 5 minutos.

**Grupo 6:** Los conductos se irrigaron con 1 ml EDTA al 17% y 5 minutos después, se secaron y se irrigaron con 4 ml de NaOCl al 5,25%, dejándolo actuar 5 minutos.

Con la finalidad de neutralizar la acción antibacteriana de la irrigación final e igualar el volumen de la solución utilizada, todos los subgrupos (1, 2, 3, 4, 5 y 6) se irrigaron con solución fisiológica estéril: en los grupos 1, 2 y 3 se usaron 9 ml; y en los grupos 4, 5 y 6, 5 ml. El volumen total de irrigación fue de 17 ml por cada diente. Se utilizaron jeringas descartables tipo Lúer y agujas de calibre 30 (Vista-Dental USA). El tiempo promedio de instrumentación fue de 4,40 minutos por conducto.

Para facilitar los pasos de la instrumentación e irrigación, los dientes se

mantuvieron en posición vertical, sostenidos con una pinza portaguijas, de tal manera que la corona quedara hacia arriba y el ápice hacia abajo.

Para asegurar la fijación, en los bocados de la pinza se talló una concavidad que garantizaba la fijación e inmovilidad de la pieza dentaria. (Fig. 5).



**Fig. 5: Diente sostenido por la pinza**

### **Recolección de las muestras bacteriológicas**

Se tomaron dos muestras bacteriológicas del conducto: una, antes de la instrumentación (PRE) y otra inmediatamente después de la irrigación final (POST).

Como paso preparatorio para la recolección de la muestra del conducto, se desinfectó la superficie externa del diente con NaOCl al 2,5%. De inmediato se irrigó el conducto con 1 ml de solución fisiológica estéril, y para desprender las bacterias adheridas a la pared del conducto, se utilizó una punta de níquel titanio 30ga (VPro, Vista Dental, USA), activada a baja velocidad, con una unidad de ultrasonido (Bonart CO LTD, San Diego, USA), durante 10 segundos (Fig. 6). Con una pipeta se aspiraron 0,02 ml del contenido del conducto y se lo descargó en un tubo eppendorf que contenía 0,98 ml de TSB.



**Fig. 6: Punta ultrasónica en el conducto**

### Procesamiento de las muestras bacteriológicas

A partir de la muestra obtenida del tubo eppendorf, se realizaron diluciones seriadas 1:10, las cuales se agitaron con Vortex durante 1 minuto. Se aspiraron 100 microlitros de las diluciones seriadas y se sembraron en placas de ATS.

Las placas se incubaron en estufa a 37° durante 48 hs, al cabo de las cuales se realizó el recuento de UFC/ml (Fig. 7 A y B). Este procedimiento se realizó por duplicado.

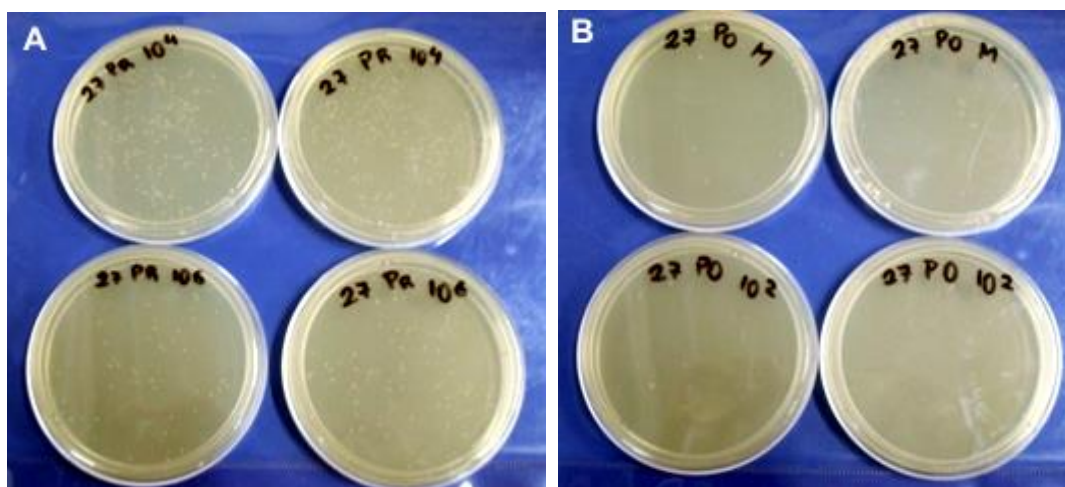
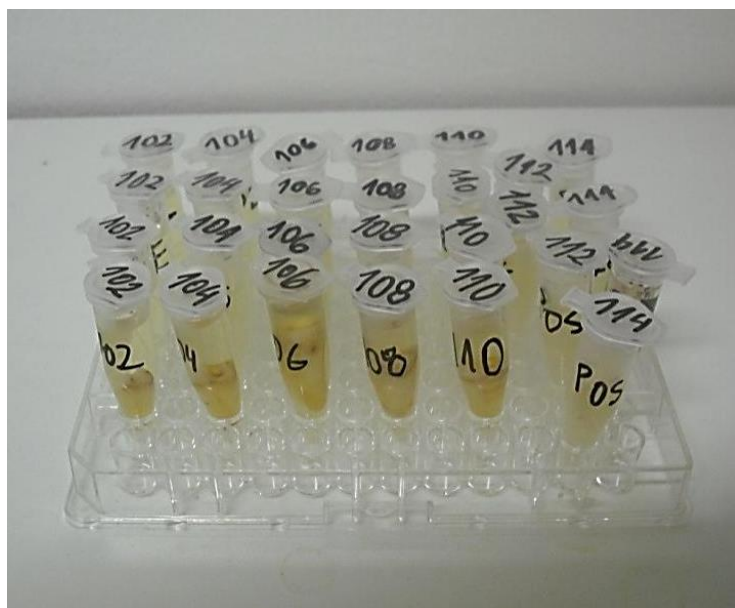


Fig. 7 : (A) Recuento de UFC/ml PRE irrigación (B) POST irrigación

### 1. C.- EVALUACIÓN DEL EFECTO A DISTANCIA DE DISTINTOS IRRIGANTES DE USO ENDODÓNTICO, EN CONDUCTOS RADICULARES INFECTADOS CON *E. faecalis*.

Finalizada la experiencia anterior, cada uno de los dientes fue colocado en posición vertical en un tubo eppendorf, de tal manera que permitiera, primero, inyectar en el conducto radicular medio de cultivo estéril TSB; y luego, llenar el tubo hasta cubrir el diente (Fig. 8). Preparados de esta manera, los dientes se incubaron en estufa a 37° durante 30 días, lapso durante el cual, se tomaron 3 muestras bacteriológicas de los conductos radiculares: a los 2, 7 y 30 días.

El procedimiento se realizó por triplicado y se evaluó por turbidimetría utilizando espectrofotometría UV-visible a 600 nm (Model 680 BioRad, Hercules, CA). Además, se realizó recuento de UFC/ml por duplicado.



**Fig. 8. Tubos eppendorf conteniendo los dientes en medio TSB**

Los datos recolectados de los estudios 1B y 1C fueron registrados en una planilla ad hoc para su posterior análisis estadístico. Se construyó una base de datos considerando los diferentes tratamientos y las variables estudiadas. Se realizó un análisis estadístico descriptivo e inferencial.

Para el análisis descriptivo se utilizaron gráficos de perfiles multivariantes de medias con 95% de Intervalo de Confianza. Para el análisis inferencial, los valores obtenidos en el recuento de UFC/ml fueron transformados en frecuencia relativa y expresados como porcentajes de reducción bacteriana. Con estos valores se realizó un análisis de la varianzaintre los diferentes irrigantes como criterio de clasificación (*test a posteriori* de Games-Howell). A fin de analizar la distribución de los valores al considerar la variable tiempo a los 0, 2, 7 y 30 días (Test de normalidad de Shapiro-Wilks,  $p < 0,001$ ), se utilizaron test no paramétricos: el Test de Wilcoxon (Mann y Whitney) y el Test de Kruskal-Wallis.

Validando los supuestos correspondientes (test de esfericidad de Bartlett, se utilizaron diferentes tipos de técnicas de análisis multivariante y el análisis factorial. Para el análisis de componentes principales y la construcción de gráficos Biplot las variables fueron estandarizadas. Se calculó el número de factores según el criterio de Kaiser y luego se utilizó la rotación Varimax. Para el análisis de Cluster se consideró un coeficiente de correlación cofenética de 0,993.

Se aceptó como nivel de significación  $\alpha$  del 5%. Se utilizaron los programas SPSS11, InfoStat 2013.

## **ESTUDIO 2: EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DENTINARIA A *E. faecalis* EN DOS GRUPOS ETARIOS.**

Con el fin de evaluar la influencia de la edad sobre la permeabilidad dentinaria, se utilizaron 18 caninos (superiores e inferiores) recientemente extraídos que fueron seleccionados y procesados del mismo modo que se describe en la selección de las muestras para el Estudio 1.

Se conformaron dos grupos de 9 piezas cada uno, según sus edades estuvieran comprendidas entre 14 y 25 años (**Grupo A**) y más de 50 años (**Grupo B**).

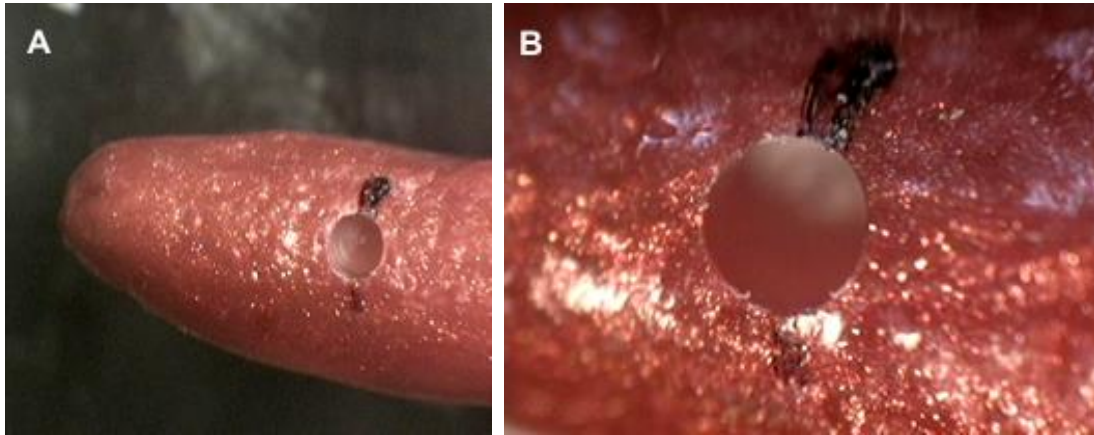
La diferencia en este estudio, respecto a los anteriores, es que los conductos se instrumentaron sólo con limas #15 y #20 (Maillefer-Dentsply-Ballaigues-Suiza) y con un pulpótomo, de la misma marca, se intentó remover la pulpa dental. Finalmente, se irrigaron con 5 ml de solución fisiológica estéril.

Posteriormente, las superficies externas de las raíces se pintaron con una doble capa de esmalte para uñas y cemento adhesivo instantáneo a base de cianoacrilato (La gotita, Poxipol, Buenos Aires) (Fig. 9)



**Fig. 9: Caninos pintados con esmalte para uñas**

Con el fin de exponer la dentina, a 6 mm del ápice radicular se talló una cavidad sobre la superficie externa (cara vestibular) de la raíz, de 1 mm de diámetro y 1mm de profundidad. Las cavidades se tallaron con un instrumento de precisión, previamente calibrado, en el Instituto CIM-INTI-Córdoba (Fig. 10 A y B).



**Fig. 10 A y B: Cavidad tallada en la superficie externa de la raíz**

Realizada la cavidad, los caninos fueron montados en un modelo experimental propuesto por el Prof. Dr. Omar Gani y empleado en las tesis de la Dra. Fabiana Franciosi (2007) y el Dr. Carlos Pascualini (2010). Cada diente fue colocado en un tubo eppendorf, al que previamente se le había seccionado su extremo inferior. De esta manera, el diente ajustaba en la abertura y el ápice la sobrepasaba (Fig. 11 A). Para asegurar la impermeabilidad, se lo selló conacrílico autopolimerizable y cemento adhesivo instantáneo a base de cianoacrilato (La gotita, Poxipol, Buenos Aires).

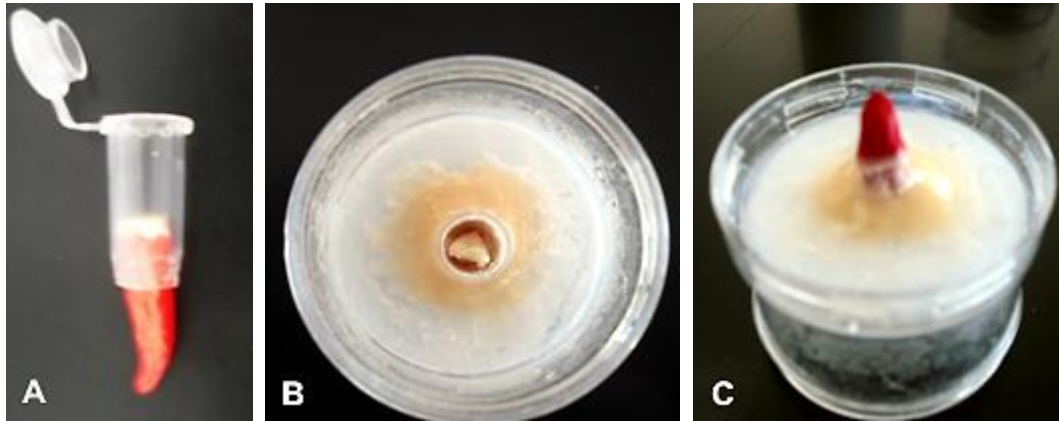
Por otra parte, se tomaron 2 frascos cilíndricos deacrílico transparente, de 5 cm de diámetro por 4 cm de altura y tapa a rosca. La base de uno de ellos, considerado como el superior, se adhirió con cemento adhesivo instantáneo (La Gotita, Poxipol, Buenos Aires) a la superficie externa de la tapa del frasco que fue identificado como inferior.

Consolidada la cementación, con piedras paraacrílico se realizó, en el fondo del frasco superior, una perforación que atravesaba, a su vez, la tapa del frasco inferior, de tal manera que ambos frascos formaran una única unidad compuestas por dos receptáculos comunicados por la perforación.

El tubo eppendorf con la pieza dentaria fijada en su interior, fue introducido en la perforación, de tal manera que, en posición vertical, la corona del diente sobresaliera hacia el frasco superior y el sector apical hacia el frasco inferior.

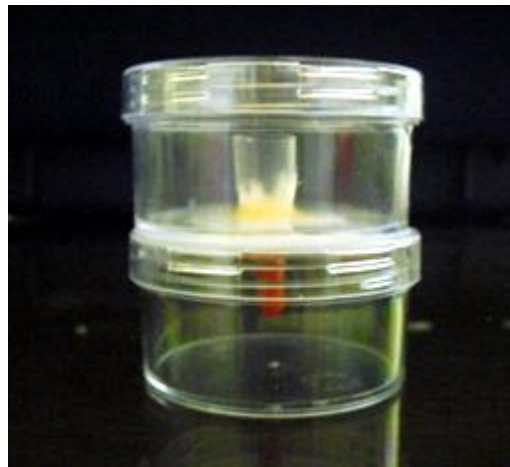
Para garantizar la impermeabilidad de la unión del tubo eppendorf a la unidad, se realizó primero una fijación conacrílico autopolimerizable y luego el sellado con una doble capa del adhesivo instantáneo tanto a nivel del frasco superior, como en el inferior (Fig. 11 B y C).





**Fig. 11: (A) Canino calzado y fijado en el tubo eppendorf, (B) Tubo eppendorf ubicado en la perforación. (C) Vista del reverso de la tapa del frasco inferior donde asoma, ya fijado a ella, el ápice del diente incluido en el tubo eppendorf.**

En la Figura 12 se muestra el modelo completo, donde se observa que el frasco superior aloja el sector coronario del diente incluido en el tubo eppendorf, mientras que en el inferior, se aprecia el sector apical del diente.

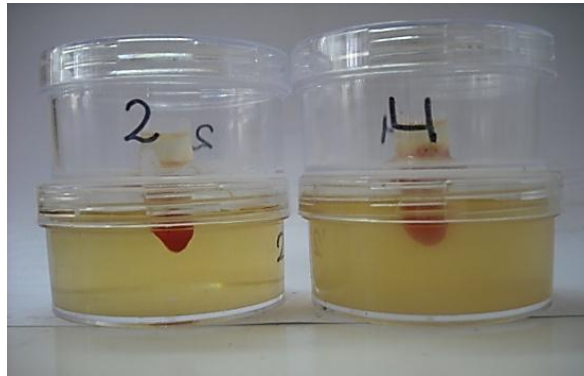


**Fig. 12: Modelo cerrado.**

Cada una de estas unidades fue colocada, individualmente, en bolsas de plástico para ser esterilizadas con gas de óxido de etileno.

Transcurridos 7 días de la esterilización, se procedió a infectar los conductos. Para ello, y con los cuidados que la operación requiere, se retiró la tapa del frasco superior. Con jeringa de tuberculina hipodérmica descartable y aguja de calibre 30ga, se inyectó en el conducto radicular 1 ml de un inóculo de *E. faecalis* ATCC 29212 ( $1 \times 10^8$  UFC/ml); tratando de llevar luego, con una lima tipo K estéril #15, la suspensión bacteriana hasta el sector apical del conducto. En el frasco inferior se colocó un medio de cultivo estéril TSB, de tal manera que cubriera la cavidad tallada en la raíz. Los modelos experimentales así preparados, se incubaron en estufa a 37° durante 30 días, renovando el inóculo del frasco superior dos veces por semana.

A los 2, 7 y 30 días se controló por turbidimetría la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano. El medio de cultivo turbio indicaba cultivo positivo, por el pasaje de *E. faecalis* desde el conducto radicular hacia el exterior de la raíz a través de los túbulos dentinarios. Por el contrario, el medio de cultivo translúcido indicaba ausencia de desarrollo bacteriano (Fig. 13).



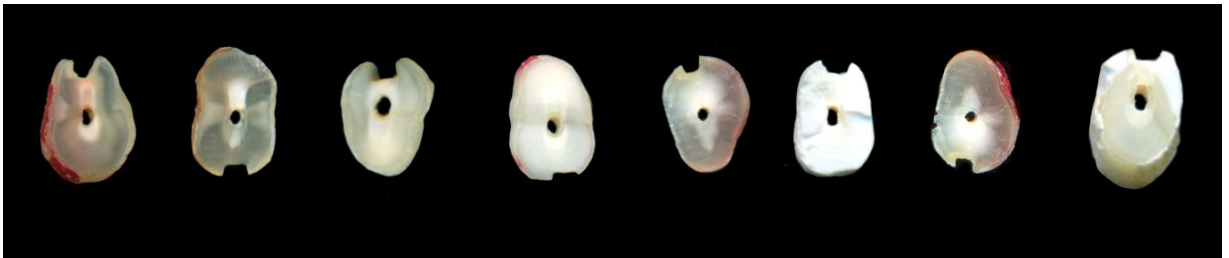
**Fig. 13: frasco #2: el medio de cultivo translúcido indicó cultivo negativo  
frasco #4: el medio de cultivo turbio indicó cultivo positivo**

Con el propósito de establecer en el espesor de dentina la distancia menor que separaba la pared del conducto del piso de la cavidad, con discos diamantados y a baja velocidad, se realizaron 2 cortes transversales de la raíz, uno por encima y otro por debajo de la perforación, de tal manera que se obtuvo una sección transversal de cada raíz que incluía la cavidad labrada en la dentina. . Posteriormente, con papel de lija al agua (Lijas Doble A, AC- 61, 1200), el corte radicular humedecido con agua fue desgastado y pulido por ambas superficies, hasta obtener una corte de aproximadamente 0,5 mm de espesor, que fue montado entre portaobjeto y cubreobjeto, para ser observados con lupa estereoscópica (Figs. 14 y 15). Sobre imágenes fotográficas digitalizadas obtenidas en lupa estereoscópica, y mediante un procesador de imágenes, se estableció, primero, el punto central del conducto para, desde él, trazar líneas radiales que llegaban a distintos puntos del piso de la cavidad. Sobre aquella de trazado menor, se midió la distancia que separaba la pared del conducto del piso de la cavidad (Fig. 16).

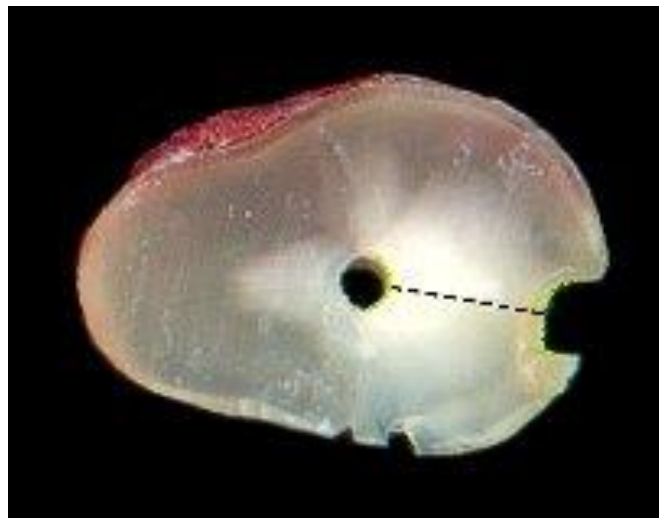
Los datos fueron tabulados y luego procesados para obtener un valor promedio de la distancia máxima y mínima que separaba el conducto del piso de la cavidad.



**Fig. 14: Cortes transversales de los caninos del Grupo A**



**Fig. 15: Cortes transversales de los caninos del Grupo B**



**Fig. 16: Registro de la medida del espesor de dentina**

## **2 A.-Evaluación de la infección de los conductos con Microscopio CONFOCAL**

Finalizado el estudio de la permeabilidad dentinaria, de los 18 caninos se seleccionaron al azar 2 piezas dentarias con cultivos positivos, uno menor de 25 años y el otro mayor de 50 años, para ser evaluados con Microscopio CONFOCAL Láser.

Los dientes se prepararon de la siguiente manera:

- 1- Se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en solución buffer de fosfato de potasio (PBS pH7.4) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 2- Posteriormente se cortaron transversalmente con un disco de diamante, a 6 mm del ápice, a la altura de la cavidad tallada en la cara vestibular.
- 3- Los cortes se colocaron en placas (24-well, Greiner Bio-One, Germany) y se lavaron con solución estéril PBS, durante 10 minutos.
- 4- Luego fueron teñidos con yoduro de propídeo 15 mM, (Sigma) durante 5 minutos a temperatura ambiente, para detectar células bacterianas en color rojo.
- 5- Se lavaron en PBS y fueron incubados con 50 mg/mL de isotiocianato de fluoresceína conjugado con A (FITC–Con A) (Sigma), durante 5 minutos a temperatura ambiente, para teñir la matriz de color verde.
- 6- Los cortes fueron observados con Microscopio CONFOCAL Láser FluoviewFV1000 Espectral Olympus CSLM (Olympus Latin America, Miami, FL), equipado con lentes UPlanSApo \_100/1.40 UIS2Olympus.

## RESULTADOS

### ESTUDIO 1-A.- INFECCIÓN IN VITRO DE LOS CONDUCTOS RADICULARES CON *E. faecalis*.

#### 1-A.2.- Evaluación de la infección de los conductos con MEB

Se seleccionaron al azar 4 premolares infectados, 2 correspondientes al grupo A y 2 al grupo B, para ser evaluados con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). En el grupo A, en un corte longitudinal, se observó desarrollo bacteriano sobre la pared dentinaria y penetrando en los túbulos dentinarios, formando un biofilm maduro de *E. faecalis* (Figs. 17 A, B, C y 18 A, B, C)

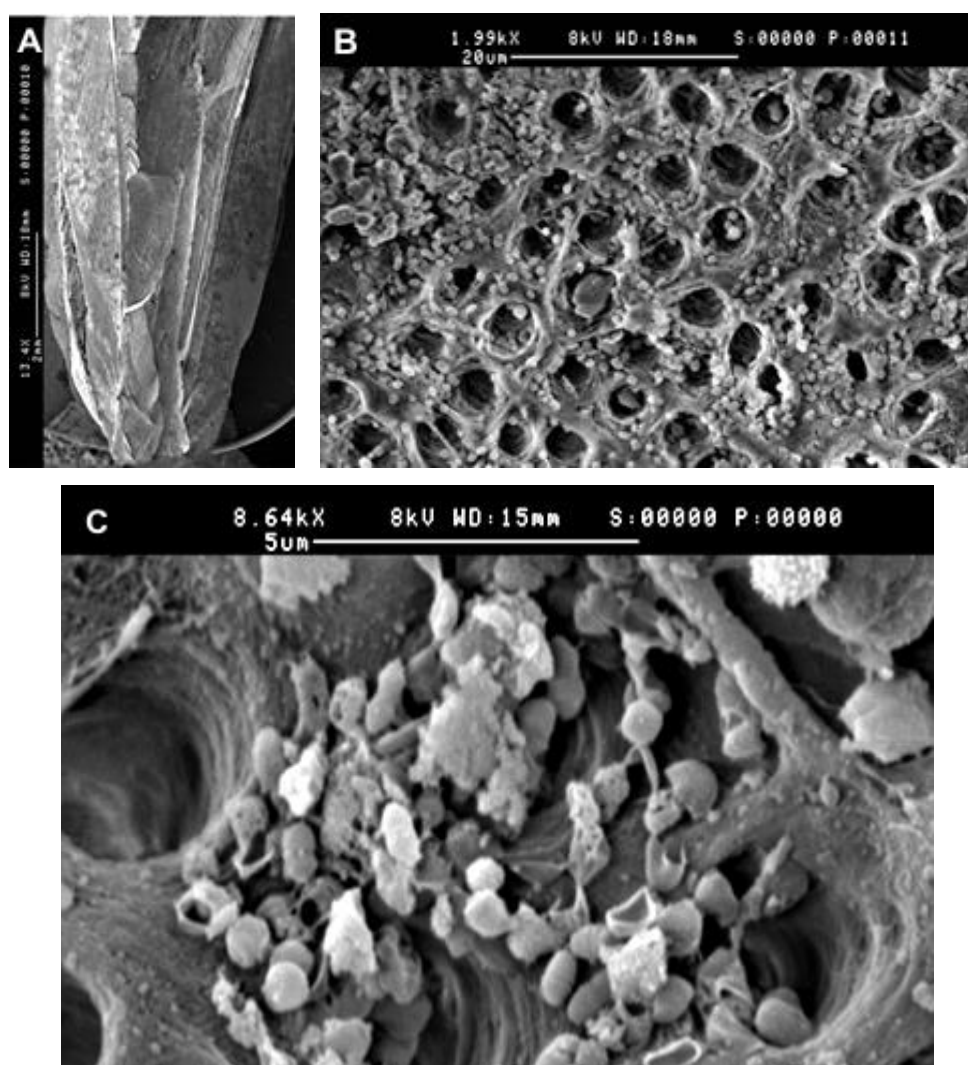


Fig. 17: Diente #1 del grupo A (A) Corte longitudinal del conducto (B) Orificios de entrada a los túbulos dentinarios abiertos, cubiertos por el biofilm de *E. faecalis*. (C) Biofilm a mayor aumento.

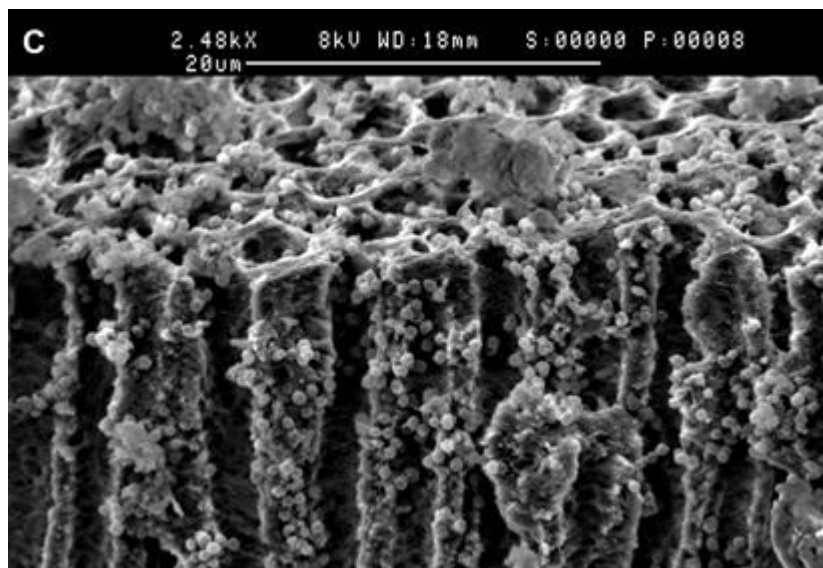
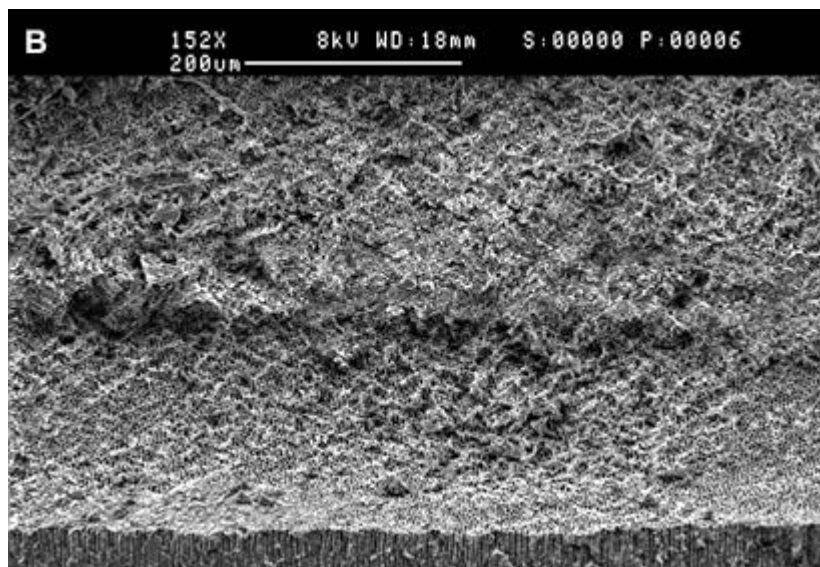
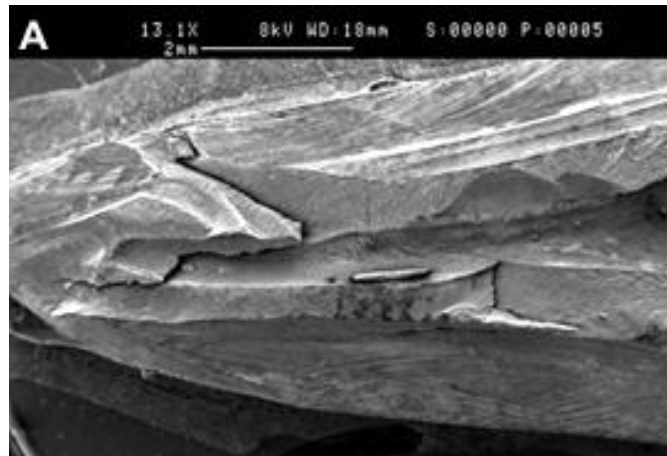


Fig. 18: Diente #2 del grupo A (A) Corte longitudinal del conducto (B) Desarrollo bacteriano sobre la pared del conducto y (C) en la profundidad de los túbulos dentinarios.

En el grupo B, se observó desarrollo de biofilm de *E. faecalis* sobre la pared dentinaria, destacándose algunas zonas de esclerosis dentinaria. (Figs. 19 A, B y 20 A, B y C)

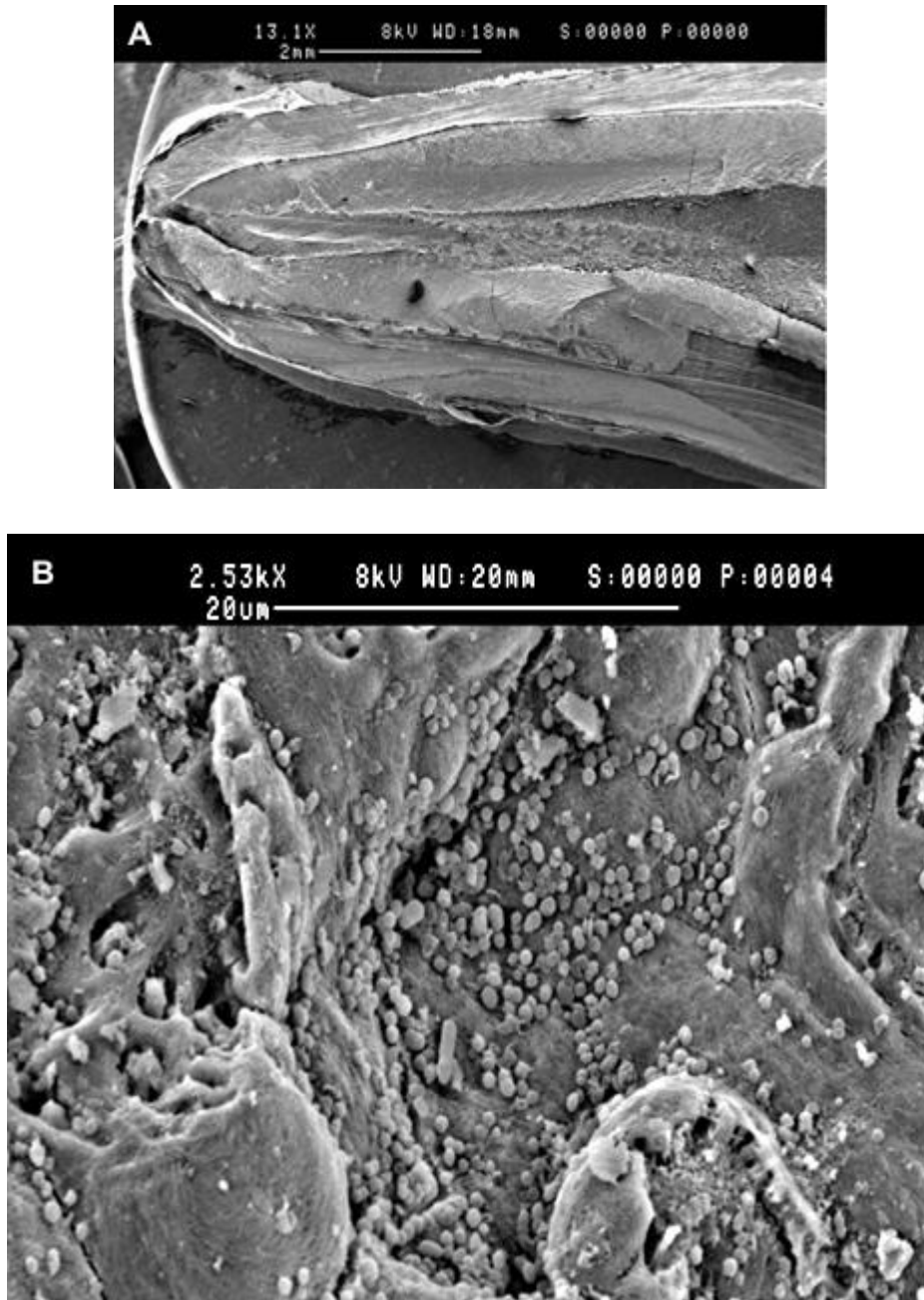


Fig. 19: Diente #3 del grupo B (A) Corte longitudinal del conducto (B) Biofilm de *E. faecalis* en el conducto con esclerosis dentinaria.

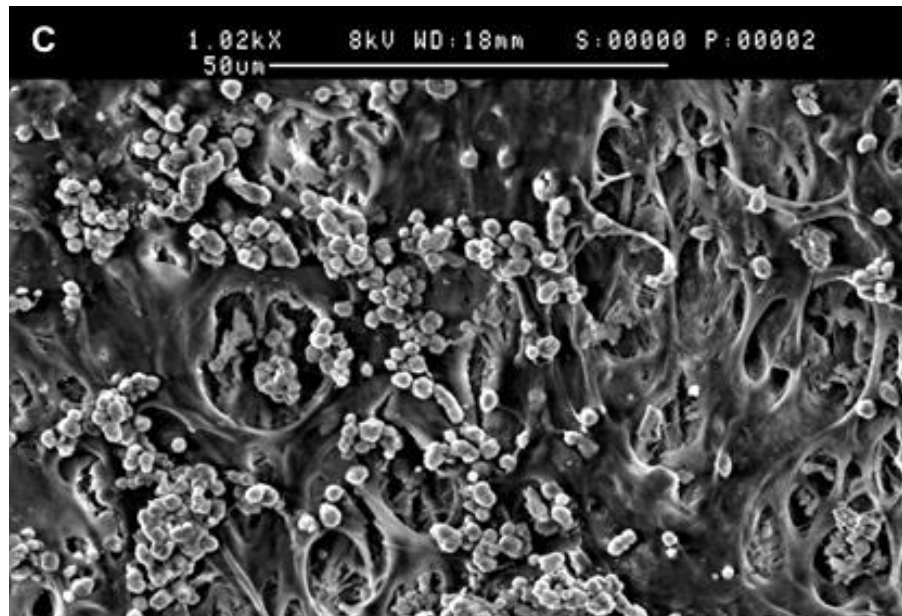
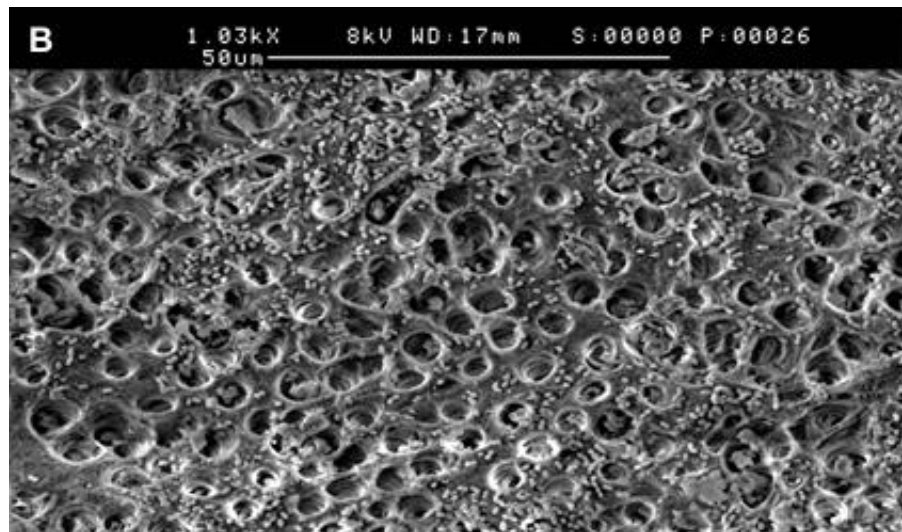
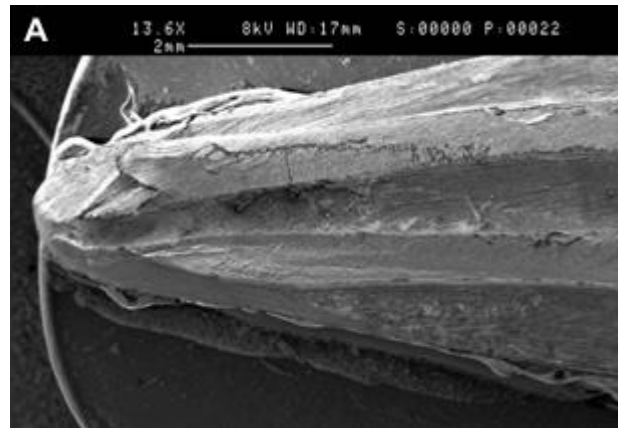


Fig. 20: Diente #4 del grupo B (A) Corte longitudinal del conducto (B) Desarrollo bacteriano sobre pared dentinaria del conducto (C) A mayor aumento, biofilm de *E. faecalis*



## 1-B.- EVALUACIÓN DEL EFECTO INMEDIATO DE DISTINTOS IRRIGANTES DE USO ENDODÓNTICO, EN CONDUCTOS RADICULARES INFECTADOS CON *E. faecalis*.

En el presente estudio se evaluó el efecto antibacteriano de diferentes protocolos de irrigación sobre *E. faecalis*, en el conducto radicular, inmediatamente después de finalizada la instrumentación e irrigación del mismo. En la Figura 21 se representa la media del recuento de UFC/ml de las muestras PRE y POST de cada uno de los dientes, de todos los grupos de irrigación. Todas las soluciones de irrigación fueron efectivas para reducir el número de UFC/ml de *E. faecalis* en el conducto radicular, a pesar que las bacterias no fueron erradicadas totalmente en ningún grupo.

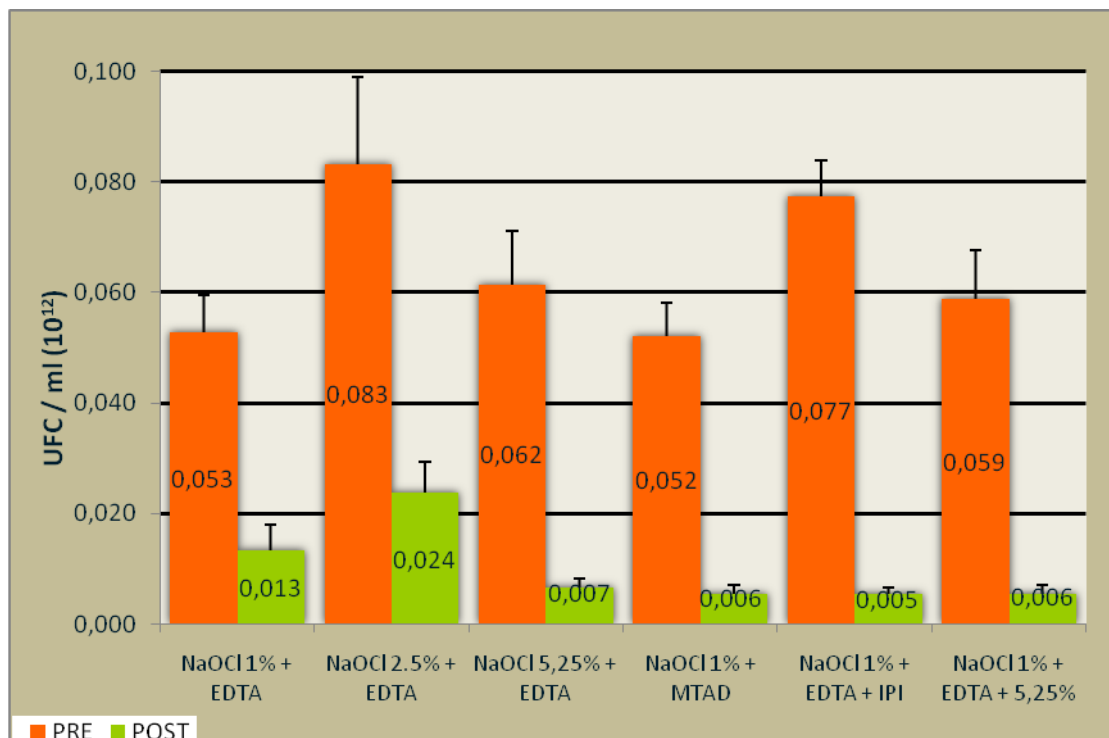


Fig. 21: Recuento bacteriano del conducto antes e inmediatamente después de la instrumentación e irrigación.

En la Tabla 1, se observa que las diferencias entre las muestras bacteriológicas PRE no resultaron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ); en tanto que en las muestras POST, si lo fueron ( $p < 0.05$ ). Al contrastar las muestras bacteriológicas de los valores POST, los grupos NaOCl 1% + EDTA + IPI, NaOCl 5,25% + EDTA + NaOCl 1% + MTAD registraron valores muy similares y las diferencias entre ellos no fueron estadísticamente significativas (Tabla 2).

Solución Irrigante	Media +/-ES. (UFC/ml x 10 <sup>12</sup> )			
	PRE (media)	ES	POST (media)	ES
NaOCl 1% + EDTA	<b>0,053</b>	0,006	<b>0,013</b>	0,010
NaOCl 2.5% + EDTA	<b>0,083</b>	0,013	<b>0,024</b>	0,007
NaOCl 5,25% + EDTA	<b>0,062</b>	0,010	<b>0,007</b>	0,001
NaOCl 1% + MTAD	<b>0,052</b>	0,007	<b>0,006</b>	0,001
NaOCl 1% + EDTA + IPI	<b>0,077</b>	0,012	<b>0,005</b>	0,002
NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%	<b>0,059</b>	0,025	<b>0,006</b>	0,003
Contraste estadístico entre irrigantes (Kruskal-Wallis)	<b>p = 0,337</b>		<b>p = 0,018*</b>	

**Tabla 1: Contraste estadístico de valores de UFC/ml entre los 6 grupos de irrigación.**

**\* Diferencias estadísticamente significativas**

Contraste inter-grupos Valores POST	NaOCl 1% + EDTA	NaOCl 2.5% + EDTA	NaOCl 5,25% + EDTA	NaOCl 1% + MTAD	NaOCl 1% + EDTA + IPI	NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%
NaOCl 1% + EDTA	-	0,081	0,444	0,619	0,688	0,999
NaOCl 2.5% + EDTA		-	<b>0,015*</b>	<b>0,011*</b>	<b>0,008*</b>	<b>0,036*</b>
NaOCl 5,25% + EDTA			-	0,753	0,852	0,570
NaOCl 1% + MTAD				-	0,974	0,338
NaOCl 1% + EDTA + IPI					-	0,436
NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%						-

**Tabla 2: Contraste múltiple. Test de Mann Whitney. \*Diferencias estadísticamente significativas.**

A partir de los valores obtenidos en el recuento de UFC/ml de las muestras PRE y POST de cada uno de los dientes, se calculó el porcentaje de reducción bacteriana en cada uno de los conductos. En la Tabla 3 se expresan la media de los valores PRE y POST del conjunto de unidades valorados en cada grupo de irrigación; y la media de los porcentajes registrados en los diferentes conductos radiculares.

Irrigante	PRE UFC/ml	POST UFC/ml	Porcentaje de Reducción bacteriana	DS
NaOCl 1% + EDTA	0,053	0,013	<b>71,43 %</b>	33.81 %
NaOCl 2.5% + EDTA	0,083	0,024	<b>74,66 %</b>	20.31 %
NaOCl 5,25% + EDTA	0,062	0,007	<b>79,83 %</b>	22.60 %
NaOCl 1% + MTAD	0,052	0,006	<b>86,76 %</b>	13.60 %
NaOCl 1% + EDTA + IPI	0,077	0,005	<b>92,54 %</b>	6.57 %
NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%	0,059	0,006	<b>89,84 %</b>	38.68 %

**Tabla 3: Porcentajes de reducción de *E. faecalis* en cada grupo de irrigación.**

Se realizó un contraste múltiple entre los porcentajes de reducción bacteriana de los diferentes irrigantes, donde se aplicó el test de Games-Howell. Los grupos que mostraron diferencias estadísticamente significativas fueron NaOCl 1% + MTAD e NaOCl 1% + EDTA + IPI. El grupo donde se usó MTAD se diferenció de todos los grupos excepto con NaOCl 1% + EDTA + 5,25%. El grupo donde se usó IPI reveló una diferencia estadísticamente significativa con respecto a todos los grupos, excepto con respecto a NaOCl al 1% + EDTA donde la diferencia no fue significativa. (Tabla 4).

Irrigante	(J) Irrigante	Diferencia entre medias (I-J)	Significación
NaOCl 1% + EDTA	NaOCl 2.5%	1,033	1,000
	NaOCl 5,25%	8,411	0,708
	MTAD	(*) 38,959	(*) <b>0,000</b>
	IPI	-9,419	0,230
	NaOCl (1% + 5,25%)	11,315	0,678
NaOCl 2.5% + EDTA	NaOCl 1%	-1,033	1,000
	NaOCl 5,25%	7,379	0,690
	MTAD	(*) 37,927	(*) <b>0,000</b>
	IPI	(*) -10,452	(*) <b>0,011</b>
	NaOCl (1% + 5,25%)	10,282	0,690
NaOCl 5,25% + EDTA	NaOCl 1%	-8,411	0,708
	NaOCl 2.5%	-7,379	0,690
	MTAD	(*) 30,548	(*) <b>0,005</b>
	IPI	(*) -17,830	(*) <b>0,002</b>
	NaOCl (1% + 5,25%)	2,904	0,999
NaOCl 1% + MTAD	NaOCl 1%	(*) -38,959	(*) <b>0,000</b>
	NaOCl 2.5%	(*) -37,927	(*) <b>0,000</b>
	NaOCl 5,25%	(*) -30,548	(*) <b>0,005</b>
	IPI	(*) -48,378	(*) <b>0,000</b>
	NaOCl (1% + 5,25%)	-27,644	0,052
NaOCl 1% + EDTA + IPI	NaOCl 1%	9,419	0,230
	NaOCl 2.5%	(*) 10,452	(*) <b>0,011</b>
	NaOCl 5,25%	(*) 17,830	(*) <b>0,002</b>
	MTAD	(*) 48,378	(*) <b>0,000</b>
	NaOCl (1% + 5,25%)	(*) 20,734	(*) <b>0,037</b>
NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%	NaOCl 1%	-11,315	0,678
	NaOCl 2.5%	-10,282	0,690
	NaOCl 5,25%	-2,904	0,999
	MTAD	27,644	0,052
	IPI	(*) -20,734	(*) <b>0,037</b>

Tabla 4: Comparaciones múltiples. Variable dependiente: Porcentaje de reducción bacteriana (%). Test de Games-Howell.\* La diferencia de medias fue significativa al nivel 0.05.

## ACCIÓN INMEDIATA DE LOS IRRIGANTES EN CADA GRUPO ETARIO

En el presente estudio se realizó un análisis del recuento de UFC/ml de las muestras PRE y POST de cada grupo de irrigación teniendo en cuenta ambos grupos etarios A y B. La interacción entre los irrigantes y grupos etarios mostraron una diferencia estadísticamente significativa. Al utilizar los diferentes irrigantes, algunos se relacionaron con la edad más que otros.

La Figura 22 representa el grupo donde se usó NaOCl 1% + EDTA, donde el valor del recuento bacteriano de las muestras POST fue mayor en el grupo A que en el B; sin embargo, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas entre ambos grupos etarios. Al aplicar el test no paramétrico para muestras relacionadas, Test de Wilcoxon, entre las muestras PRE y POST las diferencias resultaron estadísticamente significativas (Tabla 5).

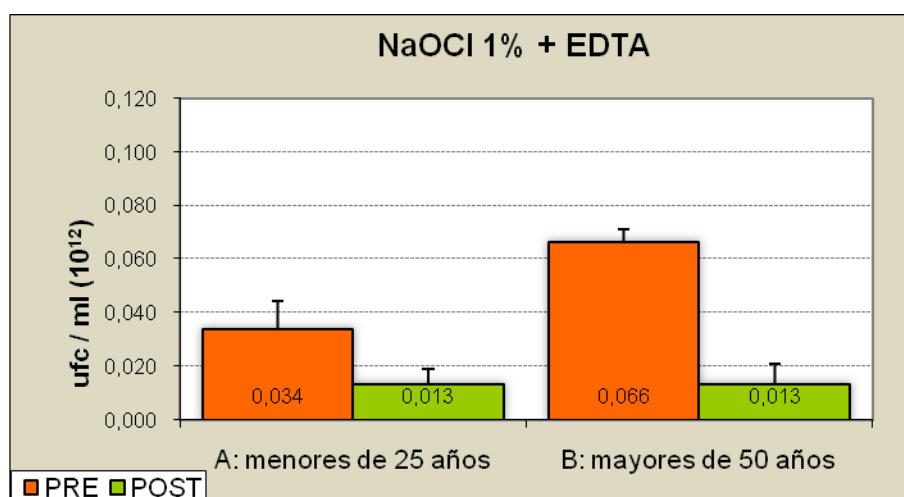


Fig. 22: Efecto antibacteriano de NaOCl 1% + EDTA en los grupos A y B. Media de UFC/ml y ES.

NaOCl 1% + EDTA	Media UFC/ml x 10 <sup>12</sup>		Contraste PRE-POST (Wilcoxon)
	Pre	Post	
A: menores de 25 años	0,034	0,013	p = 0,043*
B: mayores de 50 años	0,066	0,013	p = 0,018*
Contraste etario (Mann-Whitney)	p = 0,018*	p = 0,639	

Tabla 5: Contraste estadístico entre los grupos A y B de NaOCl 1% + EDTA.

\* Diferencias estadísticamente significativas.

La Figura 23 representa el recuento de UFC/ml de las muestras PRE y POST de los grupos de NaOCl 2,5% + EDTA en ambos grupos etarios. Las diferencias entre las muestras PRE y POST del grupo B revelaron diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, las diferencias no fueron significativas al relacionar las muestras POST del grupo A con el B. (Tabla 6).

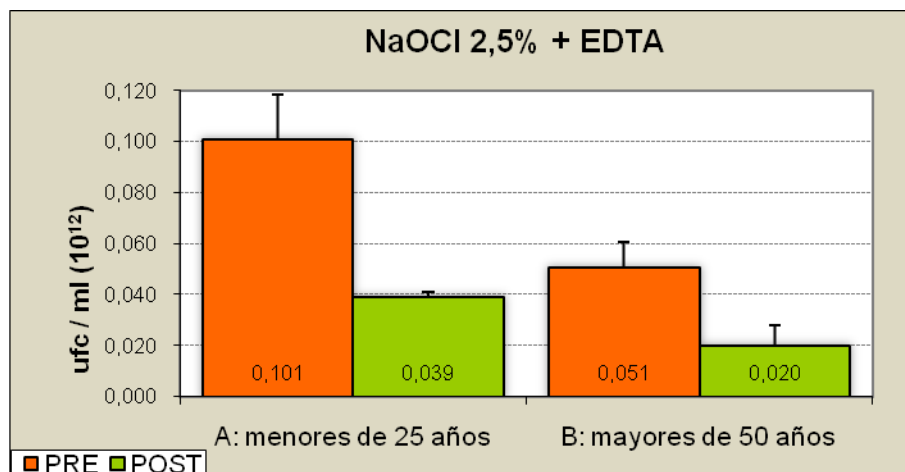


Fig. 23: Efecto antibacteriano del NaOCl 2,5% + EDTA en los grupos A y B. Media de UFC/ml y ES.

NaOCl 2,5% + EDTA	Media UFC/ml x 10 <sup>12</sup>		Contraste PRE-POST (Wilcoxon)
	Pre	Post	
A: menores de 25 años	0,101	0,039	p = 0,109
B: mayores de 50 años	0,051	0,020	<b>p = 0,018*</b>
Contraste etario (Mann-Whitney)	p = 0,095	p = 0,167	

Tabla 6: Contraste estadístico en los grupos A y B en el grupo de NaOCl 2,5% + EDTA.

\*Diferencias estadísticamente significativas

En el grupo NaOCl 5,25% + EDTA, representado en las Figura 24, el recuento bacteriano de las muestras POST fue menor en el grupo A que en el B; con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos etarios. Al relacionar las muestras PRE y POST las diferencias estadísticas fueron significativas (Tabla 7).

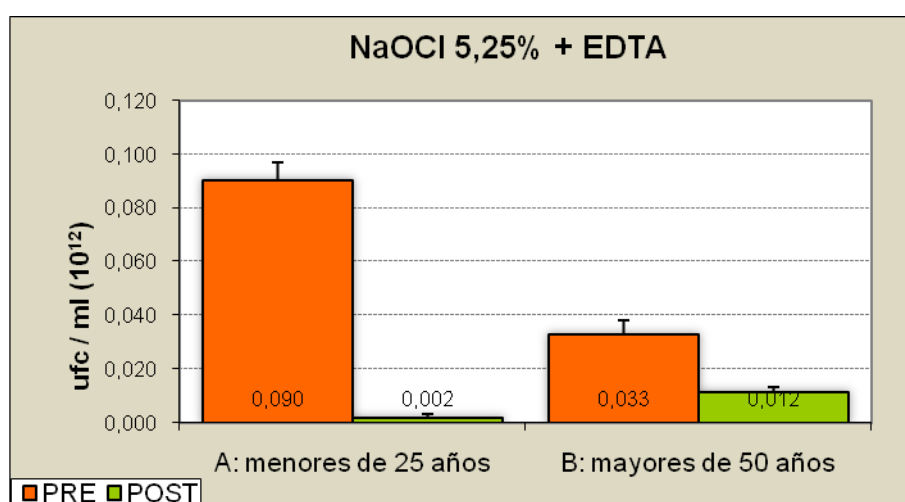
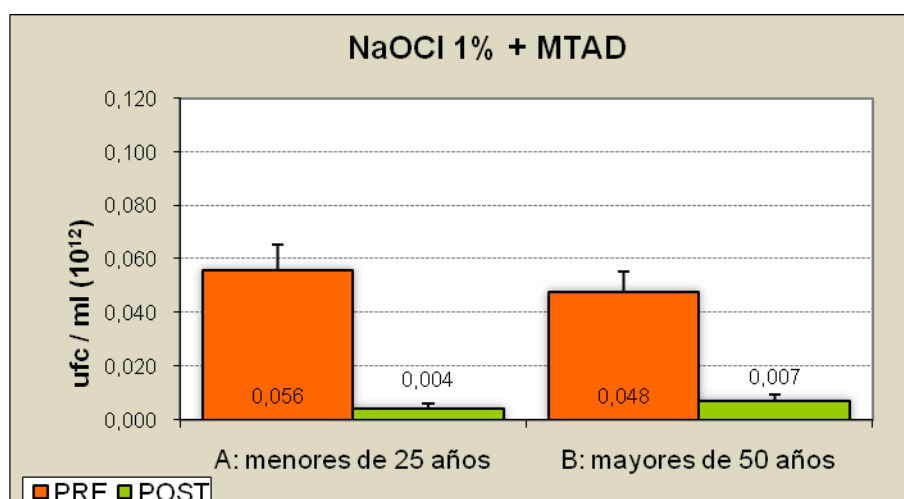


Fig. 24: Efecto antibacteriano de NaOCl 5,25% + EDTA en los grupos A y B. Media de UFC/ml y ES.

NaOCl 5,25% + EDTA	Media UFC/ml x 10 <sup>12</sup>		Contraste PRE-POST (Wilcoxon)
	PRE	POST	
A: menores de 25 años	0,090	0,002	<b>p = 0,028*</b>
B: mayores de 50 años	0,033	0,012	<b>p = 0,028*</b>
Contraste etario (Mann-Whitney)	<b>p = 0,006*</b>	<b>p = 0,004*</b>	

**Tabla 7: Contraste estadístico entre los grupos A y B del grupo de NaOCl 5,25% + EDTA.**  
\*Diferencias estadísticamente significativas

En el grupo NaOCl 1% + MTAD, representado en las figura 25, el recuento bacteriano de las muestras POST fue menor en el grupo A que en el B; a pesar que la diferencia no fue estadísticamente significativa entre ambos grupos etarios. Al relacionar las muestras PRE y POST las diferencias estadísticas resultaron significativas (Tabla 8).



**Fig. 25: Efecto antibacteriano de NaOCl 1% + MTAD en los grupos A y B. Media de UFC/ml y ES.**

NaOCl 1% + MTAD	Media UFC/ml x 10 <sup>12</sup>		Contraste PRE-POST (Wilcoxon)
	PRE	POST	
A: menores de 25 años	0,056	0,004	<b>p = 0,028*</b>
B: mayores de 50 años	0,048	0,007	<b>p = 0,043*</b>
Contraste etario (Mann-Whitney)	p = 0,792	p = 0,429	

**Tabla 8: Contraste estadístico entre los grupos A y B del grupo de NaOCl 1% + MTAD**  
\*Diferencias estadísticamente significativas

En las Figura 26 están representados el recuento de UFC/ml de las muestras PRE y POST de NaOCl 1% + EDTA + IPI en ambos grupos etarios. Las diferencias entre las muestras PRE y POST fueron estadísticamente significativas en ambos grupos etarios; sin embargo, las diferencias no fueron significativas al relacionar las muestras POST del grupo A con el B. (Tabla 9).

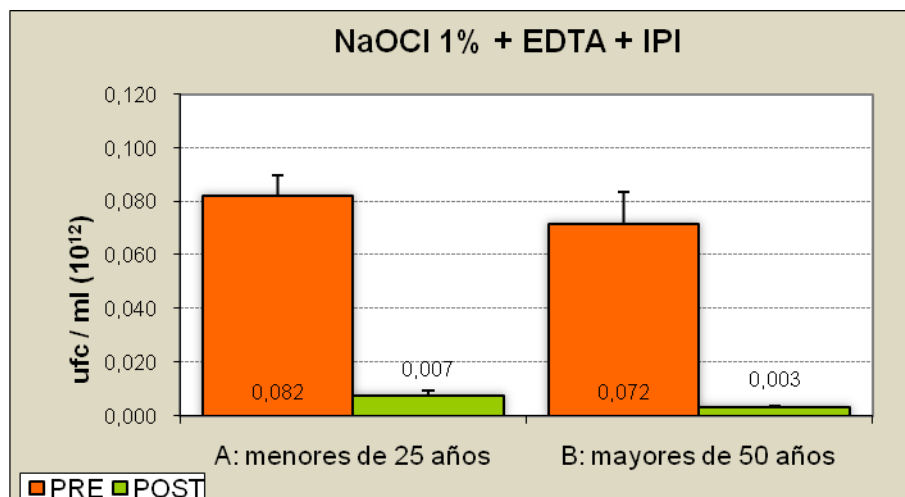


Fig. 26: Efecto antibacteriano de NaOCl 1% + EDTA+ IPI en los grupos A y B. Media de UFC/ml y ES.

NaOCl 1% + EDTA + IPI	Media UFC/ml x 10 <sup>12</sup>		Contraste PRE-POST (Wilcoxon)
	PRE	POST	
A: menores de 25 años	0,082	0,007	<b>p = 0,028*</b>
B: mayores de 50 años	0,072	0,003	<b>p = 0,042*</b>
Contraste etario (Mann-Whitney)	p = 0,429	p = 0,126	

Tabla 9: Contraste estadístico entre los grupos A y B del grupo NaOCl 1% + EDTA+ IPI.  
\*Diferencias estadísticamente significativas

En la Figura 27 están representados el recuento de UFC/ml de las muestras PRE y POST del grupo NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25% donde se observa que si bien la infección inicial fue mayor en el grupo A que en el B, las diferencias estadísticas no fueron significativas. Al aplicar el Test de Wilcoxon para contrastar las muestras PRE y POST en cada grupo etario, las diferencias no fueron significativas (Tabla 10).

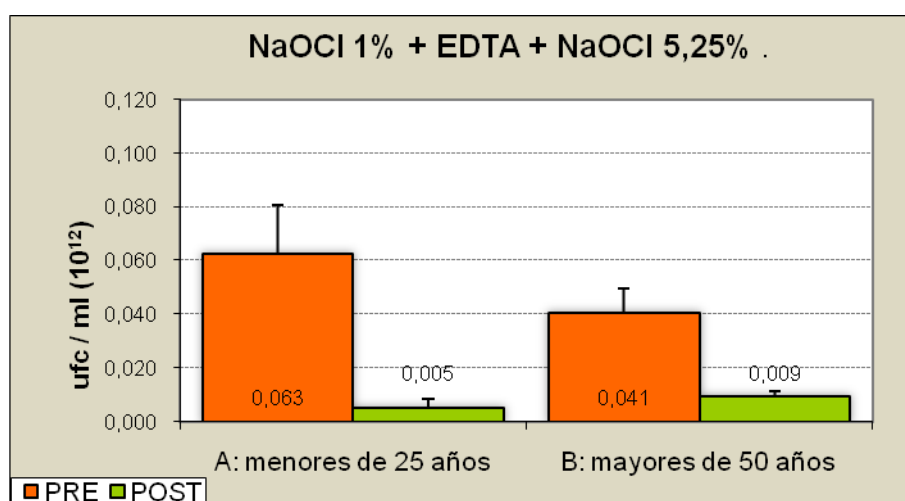


Fig. 27: Efecto antibacteriano de NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25% en los grupos A y B. Media de UFC/ml y ES.

NaOCl al 1% +EDTA+ NaOCl 5,25%	Media UFC/ml x 10 <sup>12</sup>		Contraste PRE-POST (Wilcoxon)
	PRE	POST	
A: menores de 25 años	0,063	0,005	p = 0,068
B: mayores de 50 años	0,041	0,009	p = 0,068
Contraste etario (Mann-Whitney)	p = 0,610	p = 0,257	

Tabla 10: Grupo NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%: Contraste estadístico entre grupos A y B.  
\*Diferencias estadísticamente significativas

En la Figura 28 se representan los dos grupos etarios, agrupando todas las muestras PRE y POST, sin especificar cada uno de los irrigantes, donde se observa que el desarrollo bacteriano PRE resultó ser superior en el grupo A respecto al grupo B, con una diferencia estadísticamente significativa. Por el contrario, el recuento bacteriano POST, no reveló diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos etarios, siendo ligeramente superior en el grupo A que en el B (Tabla 11).

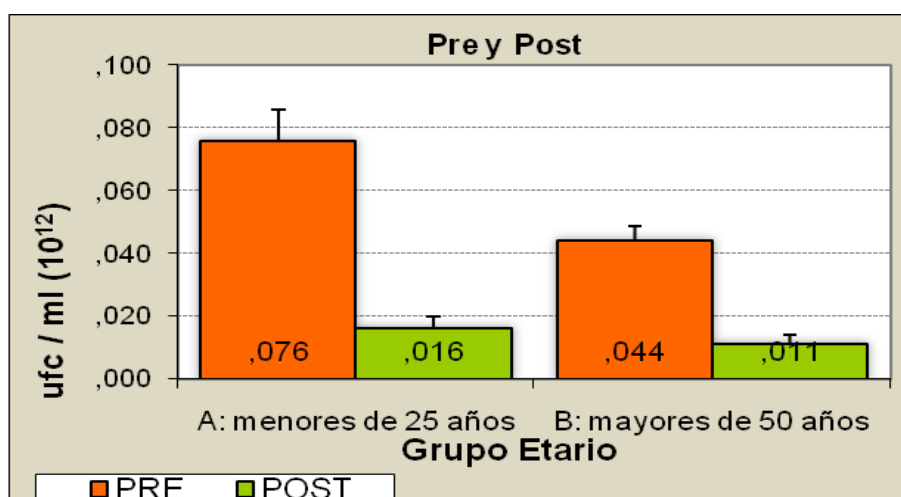


Fig. 28: Acción antibacteriana inmediata de todos los irrigantes en ambos grupos etarios. Media de UFC/ml y ES.

Grupo Etario	Media UFC/ml x 10 <sup>12</sup>		Contraste PRE- POST (Wilcoxon)
	PRE	POST	
A: menores de 25 años	0,076	0,016	p < 0,001*
B: mayores de 50 años	0,044	0,011	p < 0,001*
Contraste etario (Mann-Whitney)	p = 0,004*	p = 0,719	

Tabla 11: Contraste estadístico de todos los irrigantes en ambos grupos etarios.  
\*Diferencias estadísticamente significativas



### 1-C.-EVALUACIÓN DEL EFECTO A DISTANCIA DE DISTINTOS IRRIGANTES DE USO ENDODÓNTICO, EN CONDUCTOS RADICULARES INFECTADOS CON *E. faecalis*.

A partir del control bacteriológico inmediato, realizado luego de la irrigación, se tomaron muestras bacteriológicas del conducto a los 2, 7 y 30 días. En el control inmediato y a los 2 días se observó que el recuento bacteriano del conducto del grupo NaOCl 1% + EDTA + IPI fue el más bajo mientras que NaOCl 2,5% + EDTA reveló el valor más alto (Figs. 29 y 30). A los 7 días, el grupo NaOCl 1% + EDTA demostró ser el más efectivo, ya que los cultivos fueron negativos; por el contrario, el mayor recuento bacteriano se observó con NaOCl 1% + MTAD (Fig. 31). A los 30 días el grupo NaOCl 1% + EDTA + IPI resultó ser el más efectivo (Fig. 32).

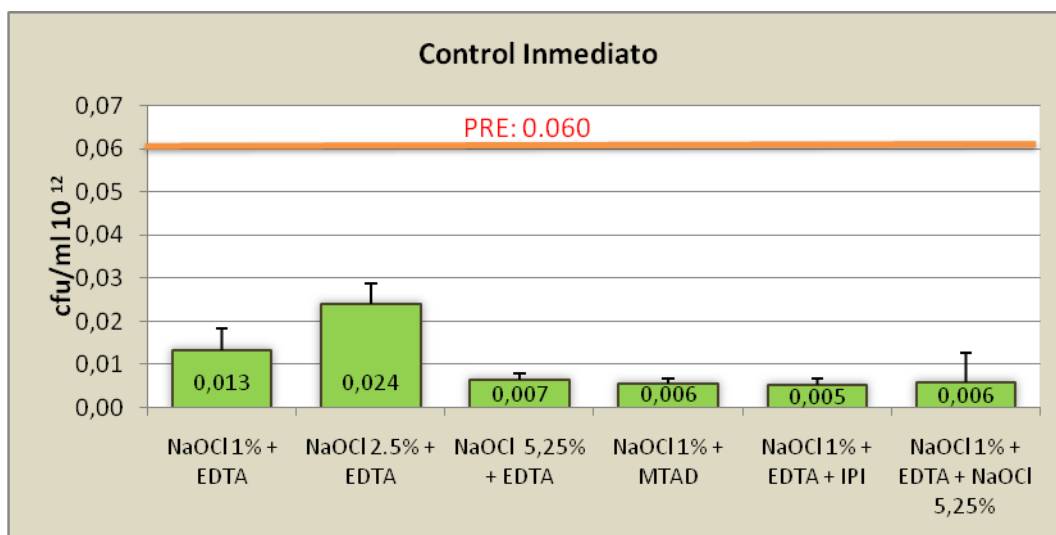


Fig. 29: Control bacteriológico del conducto POST irrigación inmediato. Media de UFC/ml y ES.

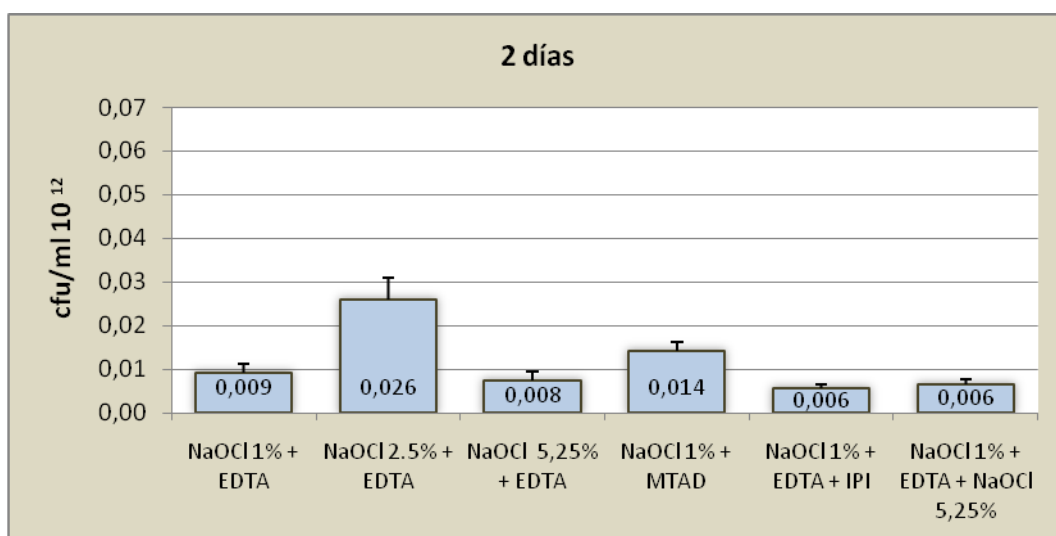


Fig. 30: Control bacteriológico del conducto a los 2 días. Media de UFC/ml y ES.

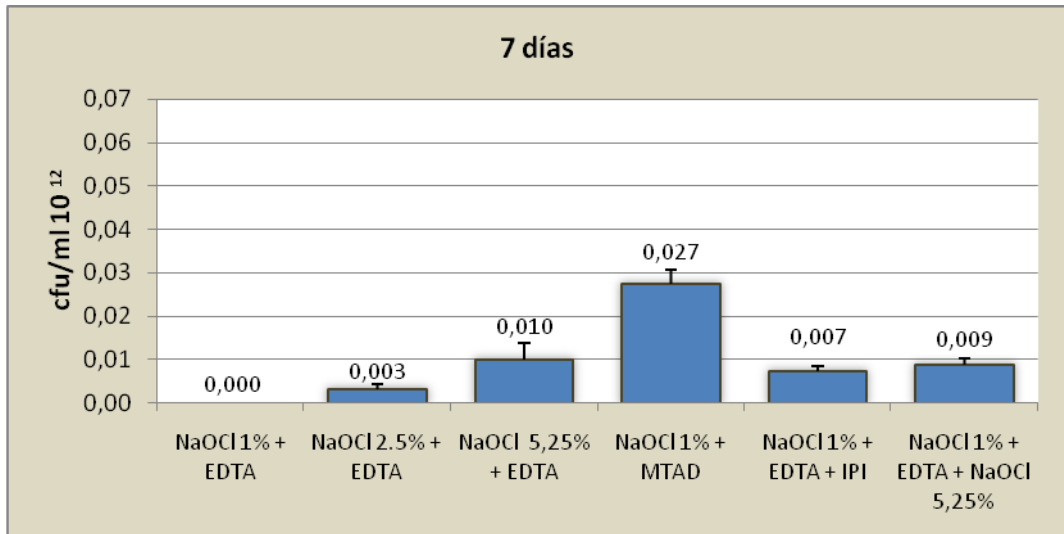


Fig. 31: Control bacteriológico del conducto a los 7 días. Media de UFC/ml y ES

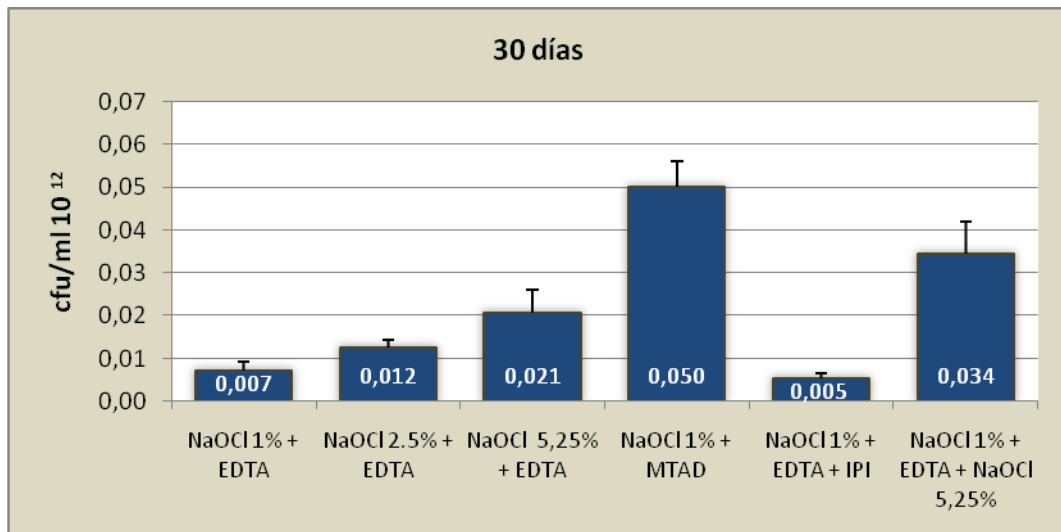


Fig. 32: Control bacteriológico del conducto a los 30 días. Media de UFC/ml y ES

En la tabla 12 se expresan los valores de las medias del recuento de UFC/ml de las muestras bacteriológicas PRE, POST (inmediato), a los 2, 7 y 30 días.

<b>Irrigante</b>	PRE UFC/ml 10 <sup>12</sup>	POST UFC/ml 10 <sup>12</sup>	2 días UFC/ml 10 <sup>12</sup>	7 días UFC/ml 10 <sup>12</sup>	30 días UFC/ml 10 <sup>12</sup>
NaOCl 1% + EDTA	0,053	0.013	0.009	0.000	0.007
NaOCl 2,5% + EDTA	0,083	0.024	0.026	0.003	0.012
NaOCl 5,25% + EDTA	0,062	0.007	0.008	0.010	0.021
NaOCl 1% + MTAD	0,052	0.006	0.014	0.027	0.050
NaOCl 1% + EDTA+IPI	0,077	0.005	0.006	0.007	0.005
NaOCl 1% + EDTA+ 5,25%	0,059	0.006	0.006	0.009	0.034

**Tabla 12: Muestras bacteriológicas PRE, POST (inmediato) y a los 2, 7 y 30 días**

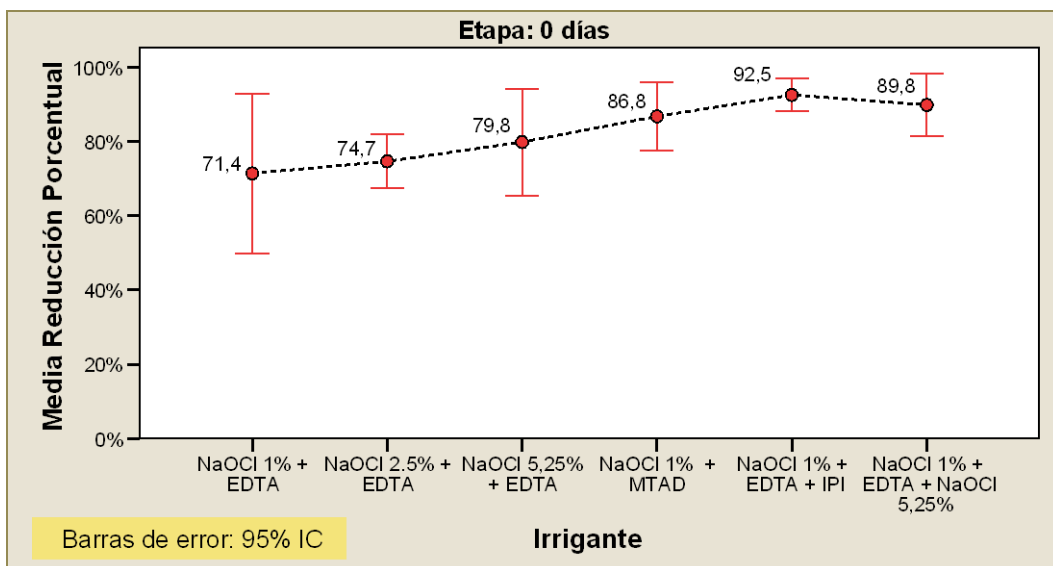
En la tabla 13 se muestran las medias de los porcentajes de reducción bacteriana registrados de cada uno de los dientes de los 6 grupos de irrigación en los diferentes tiempos. Los porcentajes se calcularon para cada uno de los dientes, teniendo en cuenta el valor de la muestra PRE respecto a las muestras POST, 2, 7 y 30 días. El grupo NaOCl 1% + EDTA + IPI reveló el mayor porcentaje de reducción bacteriana en las muestras inmediatas, a los 2 y 30 días; mientras que a los 7 días el grupo NaOCl 1% + EDTA mostró el valor más alto de reducción bacteriana.

<b>Irrigante</b>	Inmediato (%)	2 días (%)	7 días (%)	30 días (%)
NaOCl 1% + EDTA	71,4	78,4	100	79,9
NaOCl 2,5% + EDTA	74,7	73,6	91,2	89,9
NaOCl 5,25%+ EDTA	79,8	76,5	87,4	50,4
NaOCl 1% + MTAD	86,8	62,4	34,4	00,0
NaOCl 1% + EDTA+ IPI	92,5	91,0	90,0	93,0
NaOCl 1% +EDTA + 5,25%	89,8	88,9	77,3	38,4

**Tabla 13: Porcentajes de reducción bacteriana del conducto radicular inmediato y a distancia**

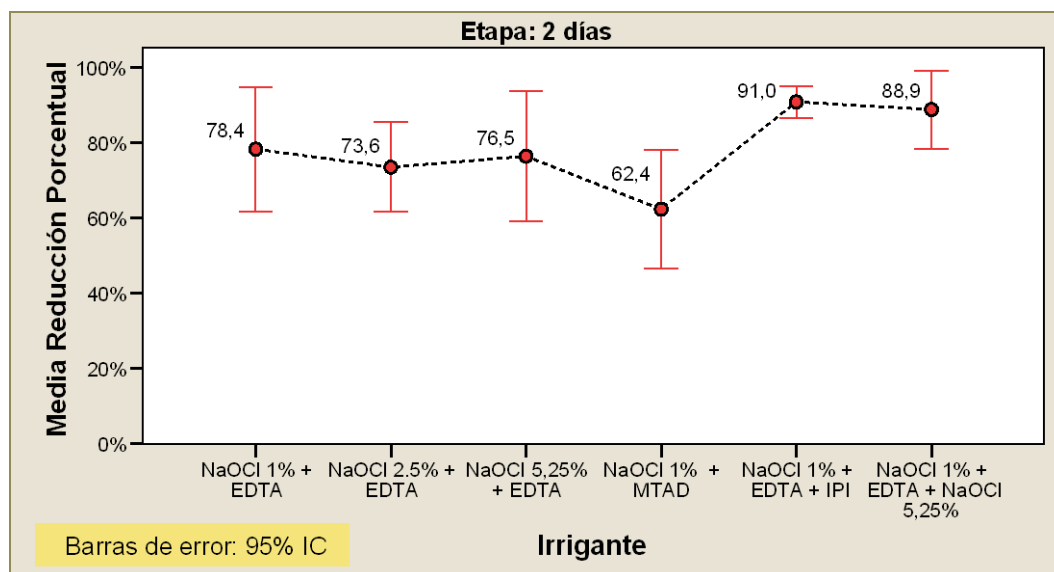
Las Figuras 33, 34, 35 y 36 son una representación lineal de las medias de los porcentajes de reducción bacteriana de cada uno de los dientes de los 6 grupos de irrigación en los diferentes tiempos.

La Figura 33 representa los porcentajes de reducción bacteriana de los grupos de irrigación en el día 0, es decir inmediatamente después de la irrigación. El análisis estadístico con ANOVA no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.



**Fig. 33: Porcentajes de reducción bacteriana de los diferentes grupos de irrigación inmediatamente después de la irrigación. Día 0.**

La Figura 34 representa los grupos de irrigación en el día 2. El análisis estadístico con ANOVA mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $p=0,033$ ). El grupo NaOCl 1% + EDTA + IPI se distanció del grupo NaOCl 1% + MTAD.



**Fig. 34: Porcentajes de reducción bacteriana de los diferentes grupos de irrigación a los 2 días.**

La Figura 35 representa los grupos de irrigación en el día 7. El análisis estadístico con ANOVA mostró una diferencia estadísticamente muy significativa entre los grupos ( $p<0,01$ ). El grupo NaOCl 1% + EDTA reveló un 100% de reducción bacteriana, mientras que NaOCl 1% + MTAD se distanció de todos los grupos con valores porcentuales más bajos.

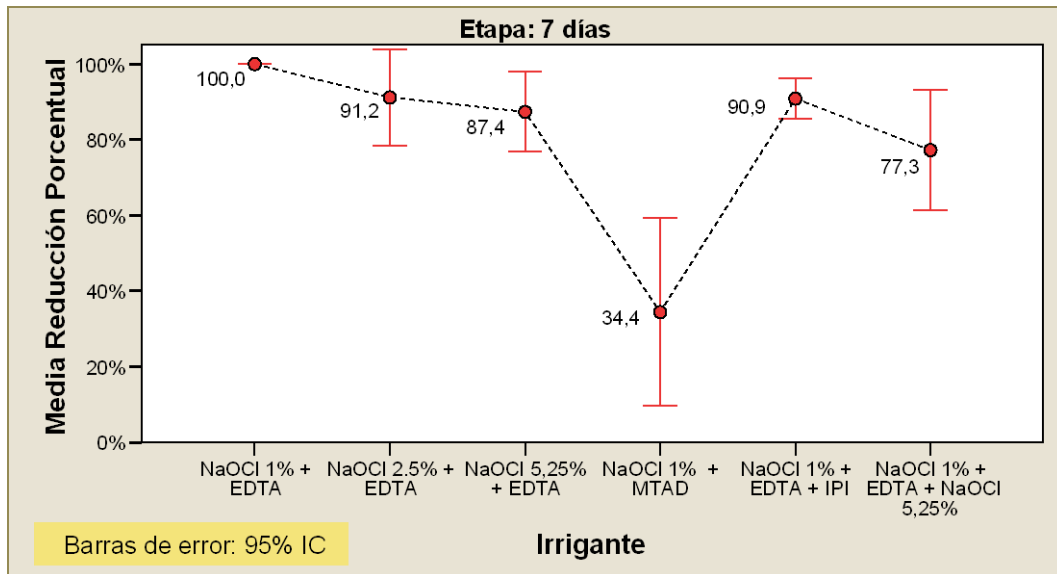


Fig. 35: Porcentajes de reducción bacteriana de los diferentes grupos de irrigación a los 7 días

La Figura 36 representa los grupos de irrigación en el día 30. El análisis estadístico con ANOVA mostró una diferencia estadísticamente muy significativa entre los grupos ( $p < 0,01$ ). El grupo NaOCl 1% + EDTA + IPI se distanció del grupo NaOCl 1% + MTAD, NaOCl 5,25% + EDTA e NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%.

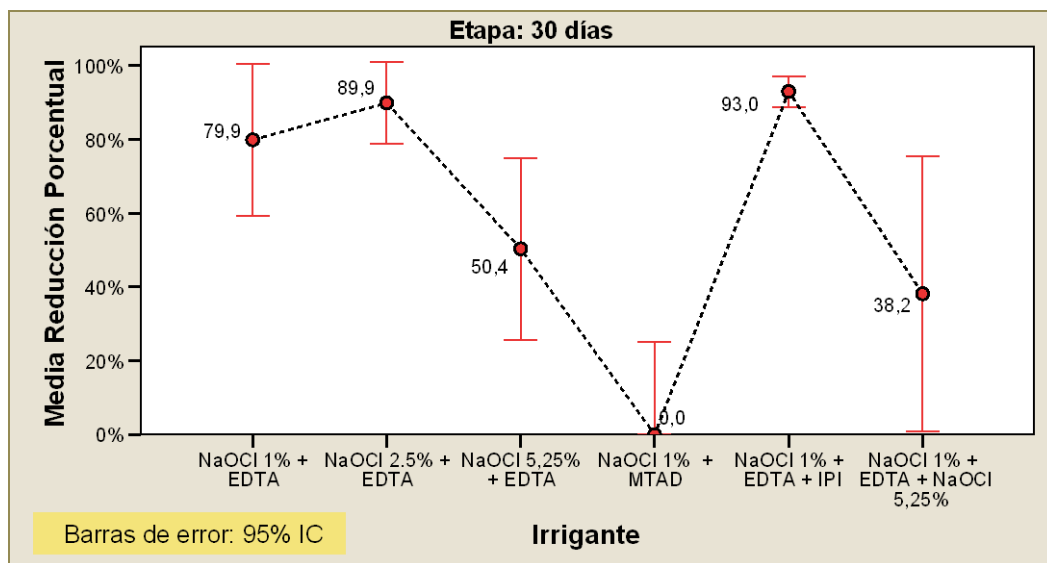


Fig. 36: Porcentajes de reducción bacteriana de los diferentes grupos de irrigación a los 30 días.

El trazado lineal de la Figura 37 representa las medias de los porcentajes registrados de cada uno de los dientes de los 6 grupos de irrigación en los diferentes tiempos.

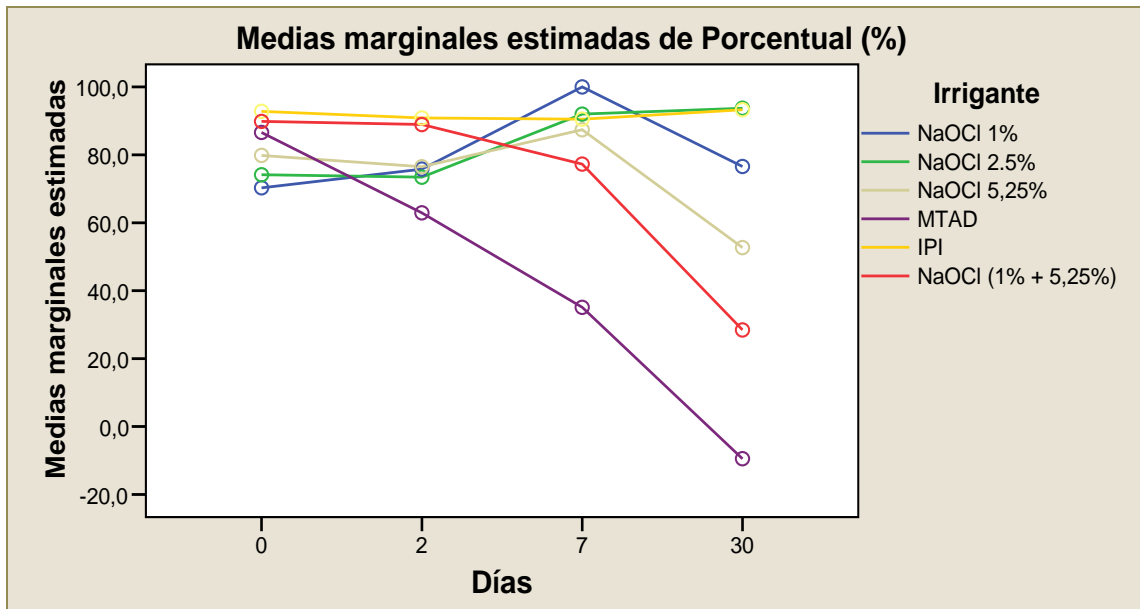
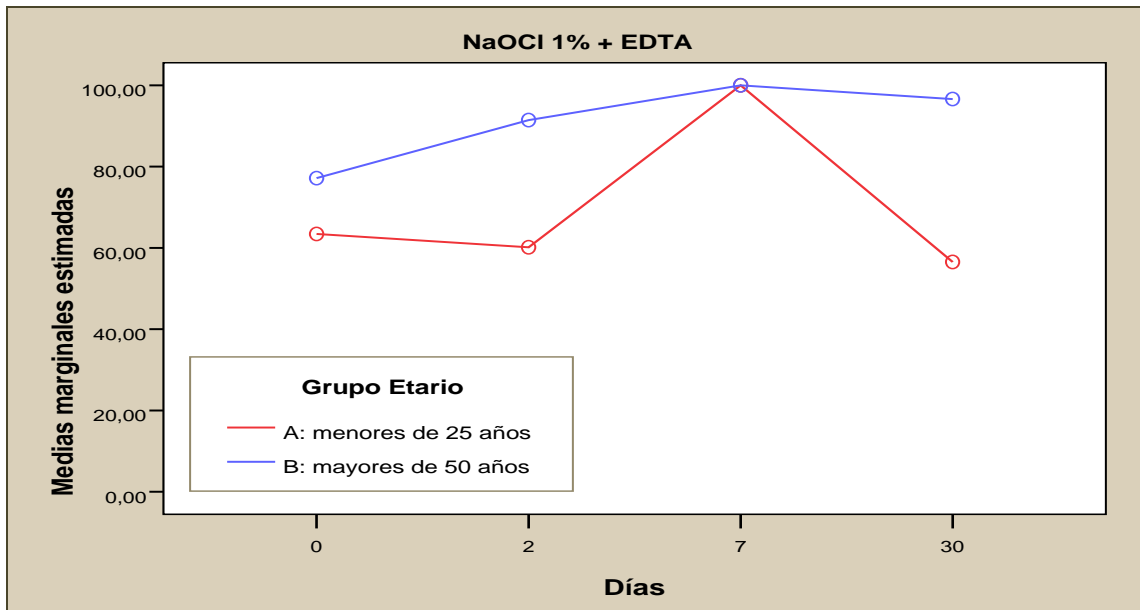


Fig. 37: Porcentajes de reducción bacteriana de los 6 grupos de irrigación en los diferentes tiempos.

## CONTROL BACTERIOLÓGICO A DISTANCIA EN CADA GRUPO ETARIO

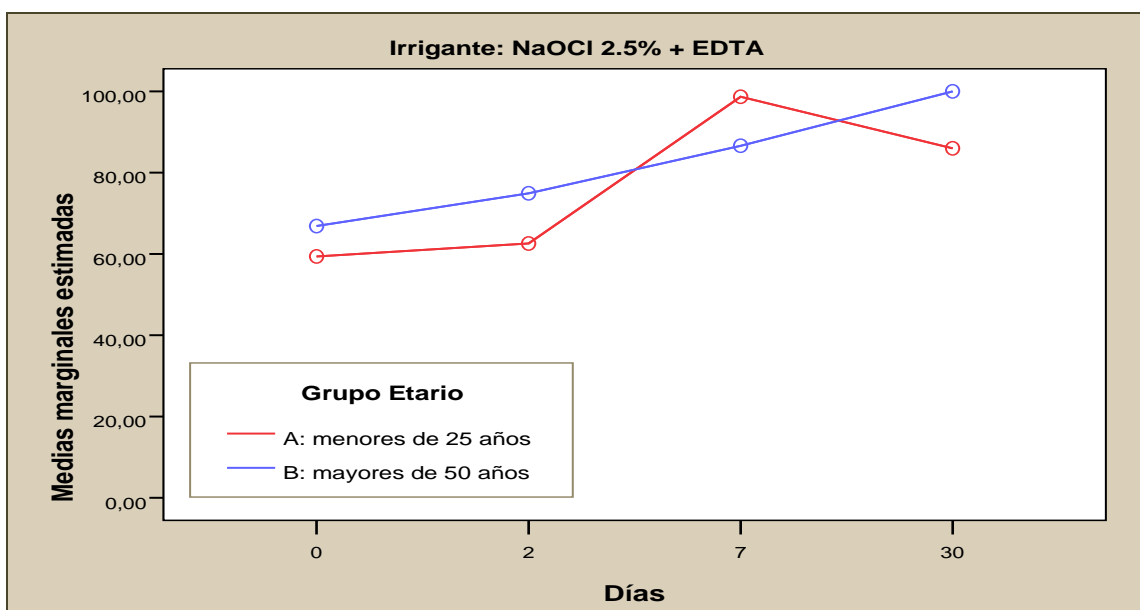
En el presente estudio se realizó un estudio del efecto residual de las diferentes soluciones de irrigación, a los 2, 7 y 30 días. En los siguientes gráficos (38, 39, 40, 41, 42 y 43) se representan los porcentajes de reducción bacteriana de cada uno de los grupos de irrigación por separado, teniendo en cuenta los dos grupos etarios, en los diferentes tiempos.

En el grupo 1, donde se usó NaOCl 1% + EDTA, se observó que el porcentaje de reducción bacteriana inmediato aumentó a los 2 días, llegando al 100% de reducción bacteriana a los 7 días, tanto en el grupo A como en el B. A los 30 días, en el grupo A bajó ligeramente el porcentaje de reducción bacteriana, mientras que en el grupo B disminuyó significativamente (Fig. 38). Al aplicar el Test ANOVA entre ambos grupos etarios, las diferencias resultaron estadísticamente significativas ( $p=0,005$ ).



**Fig. 38: Grupo NaOCl 1% + EDTA. Medias marginales estimadas de los porcentajes de reducción bacteriana en ambos grupos etarios.**

En el grupo 2, donde se usó NaOCl 2,5% + EDTA, se observó una reducción bacteriana inmediata, la cual fue aumentando a partir de los 2 días hasta los 7 días en ambos grupos etarios. A los 30 días en el grupo A disminuyó el porcentaje de reducción, mientras que en el grupo B aumentó; sin embargo, el porcentaje de reducción bacteriana en ambos grupos a los 30 días fue mayor que los valores inmediatos (Fig. 39). Al aplicar el Test ANOVA entre ambos grupos etarios, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p= 0,615$ ).



**Fig. 39: Grupo NaOCl 2,5% + EDTA. Medias marginales estimadas de los porcentajes de reducción bacteriana en ambos grupos etarios.**

En el grupo 3, donde se usó NaOCl 5,25% + EDTA, se observó una marcada disminución bacteriana inmediata en el grupo A, la cual se mantuvo a los 2 días, comenzando a bajar a los 7 días hasta los 30 días, donde se observó que el porcentaje de reducción bacteriana fue menor que el inmediato. En el grupo B, la reducción bacteriana fue menor que en el grupo A (Fig. 40). ). Al aplicar el Test ANOVA entre ambos grupos etarios, las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ).

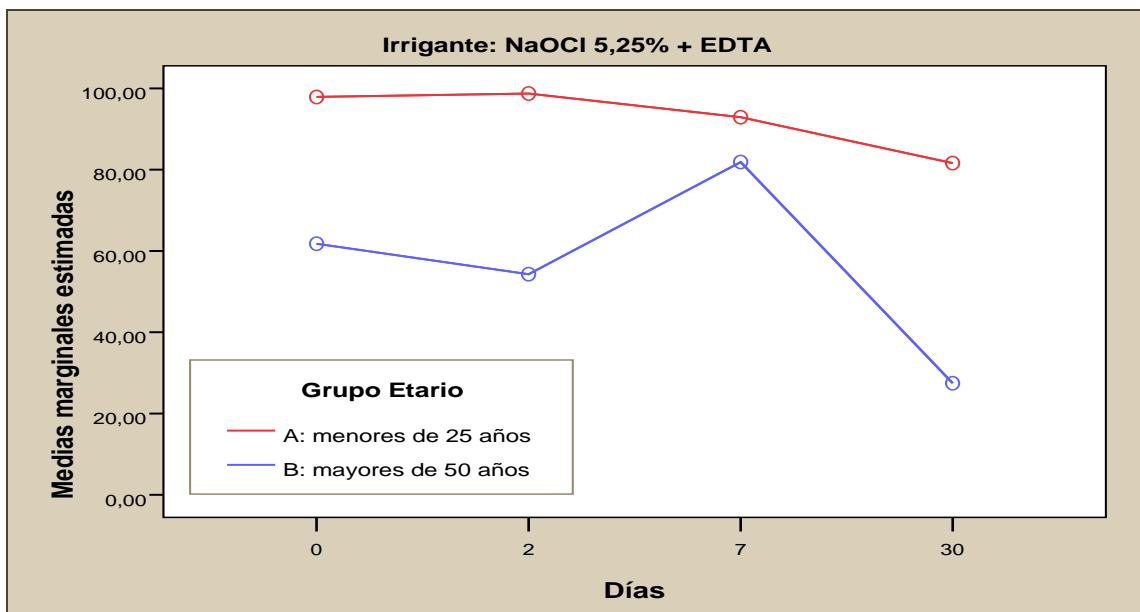
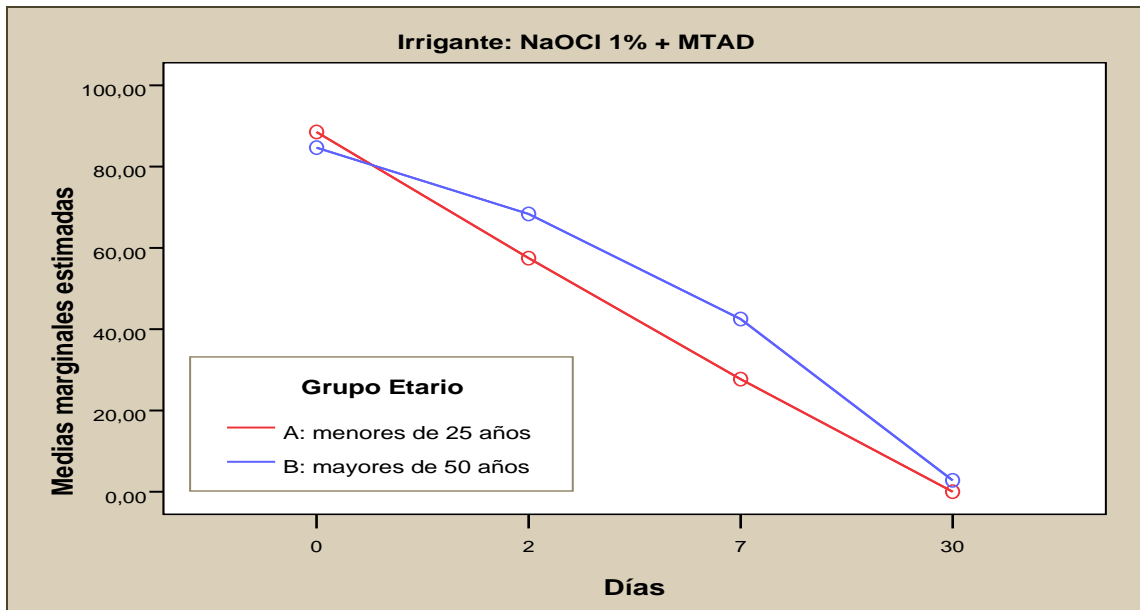


Fig. 40: Grupo NaOCl 5,25% + EDTA. Medias marginales estimadas de los porcentajes de reducción bacteriana en ambos grupos etarios.

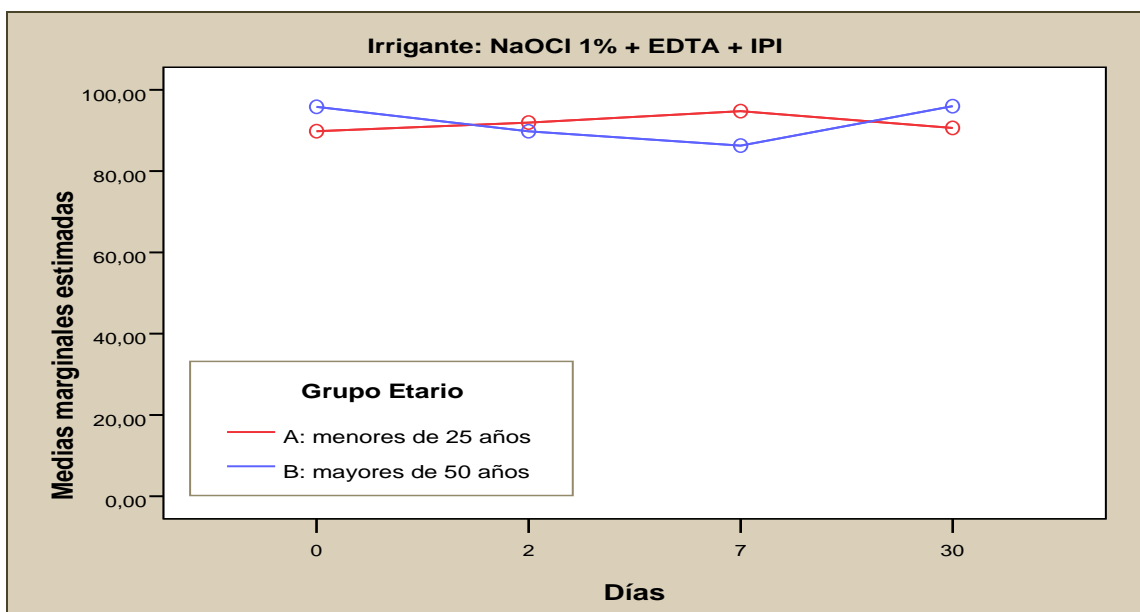
En el grupo 4, donde se usó NaOCl 1% + MTAD en la irrigación final, en ambos grupos etarios se observó una marcada reducción bacteriana inmediata, pero luego comenzó a disminuir leve y paulatinamente hasta los 30 días, donde hubo reinfección de los conductos radiculares. En el grupo A el porcentaje de reducción bacteriana fue menor que en el grupo B (Fig. 41). Al aplicar el Test ANOVA entre ambos grupos etarios, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p = 0,482$ ).





**Fig. 41: Grupo NaOCl 1% + MTAD Medias marginales estimadas de los porcentajes de reducción bacteriana en ambos grupos etarios.**

En el grupo 5, donde se usó NaOCl 1% + EDTA + IPI, se observó una marcada reducción bacteriana inmediata, manteniéndose estable en el tiempo hasta los 30 días. Los valores fueron similares en ambos grupos etarios. (Fig.42) Al aplicar el Test ANOVA entre ambos grupos etarios, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p = 0,926$ ).



**Fig. 42: Medias marginales estimadas de los porcentajes de reducción bacteriana del grupo NaOCl 1% + EDTA + IPI, en ambos grupos etarios.**

En el grupo 6, donde se usó NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25% se observó una marcada reducción bacteriana inmediata y a los 2 días; la cual comenzó a disminuir a los 7 días. A los 30 días, en ambos grupos etarios, el porcentaje de reducción bacteriana fue menor que el observado inmediatamente, siendo muy bajo en el grupo B (Fig.43). Al aplicar el Test ANOVA entre ambos grupos etarios, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p = 0,705$ ).

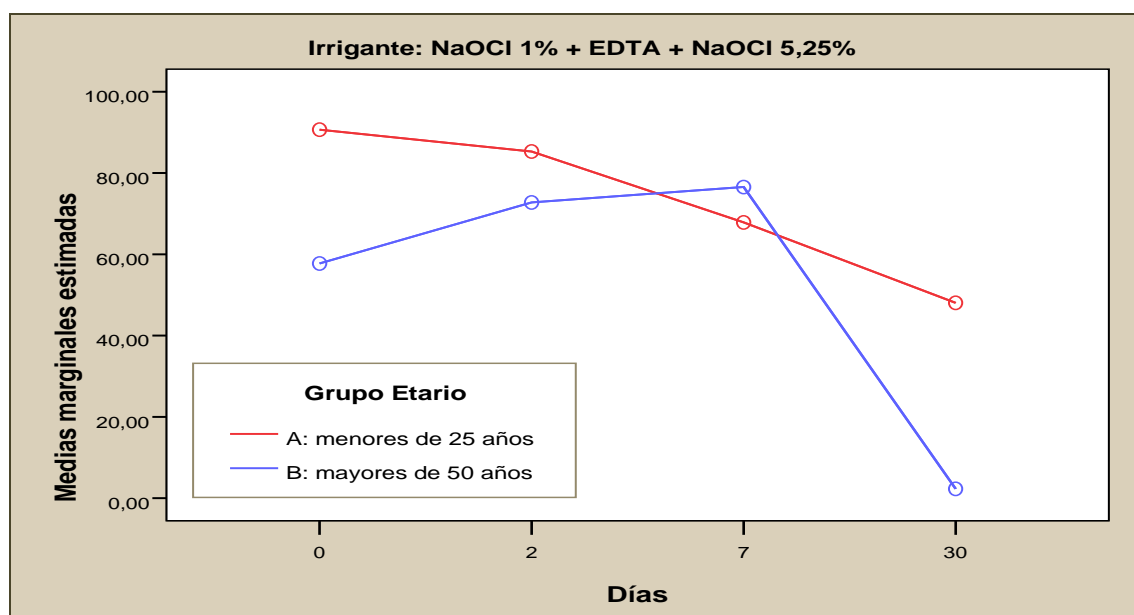


Fig. 43: Medias marginales estimadas de los porcentajes de reducción bacteriana del Grupo NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%, en ambos grupos etarios.

Finalmente, se realizó un análisis multivariante por medio de ANOVA factorial entre irrigante, tiempo y grupo etario. Las diferencias entre irrigantes fueron significativas, como así también entre etapas, pero no lo fueron entre grupos etarios. La interacción entre irrigantes y tiempo (inmediato, 2, 7 y 30 días); e irrigante y grupo etario revelaron diferencias estadísticamente significativas; mientras que las diferencias no fueron significativas entre la interacción tiempo y grupo etario. La interacción entre los 3 factores: irrigante, tiempo y edad no fue estadísticamente significativa (Tabla 14).

Factores	Significación (p-valor)
Irrigante	(*) 0,000
Días	(*) 0,000
Grupo etario	0,632
Irrigante * Días	(*) 0,000
Irrigante * Grupo etario	(*) 0,000
Días * Grupo etario	0,921
Irrigante * Días * Grupo etario	0,103

Tabla 14: Test ANOVA.

El análisis multivariado se representa en la Figura 44 a través de un gráfico Biplot, donde se analizan los componentes principales (observaciones-irrigantes- y variables- inmediato, 2, 7 y 30 días). La primera componente CP1 explica la mayor variabilidad del 60,2 % y separa el grupo NaOCl 1% + MTAD de los otros grupos de irrigación. Respecto a las variables tiempo (2, 7 y 30 días) están correlacionados ya que señalan un mismo proceso de reducción bacteriana. La segunda componente explica el 33,5 % de la variabilidad y separa los 3 grupos donde se realizó una irrigación final con una solución antibacteriana, de los 3 grupos donde se terminó la irrigación con EDTA.

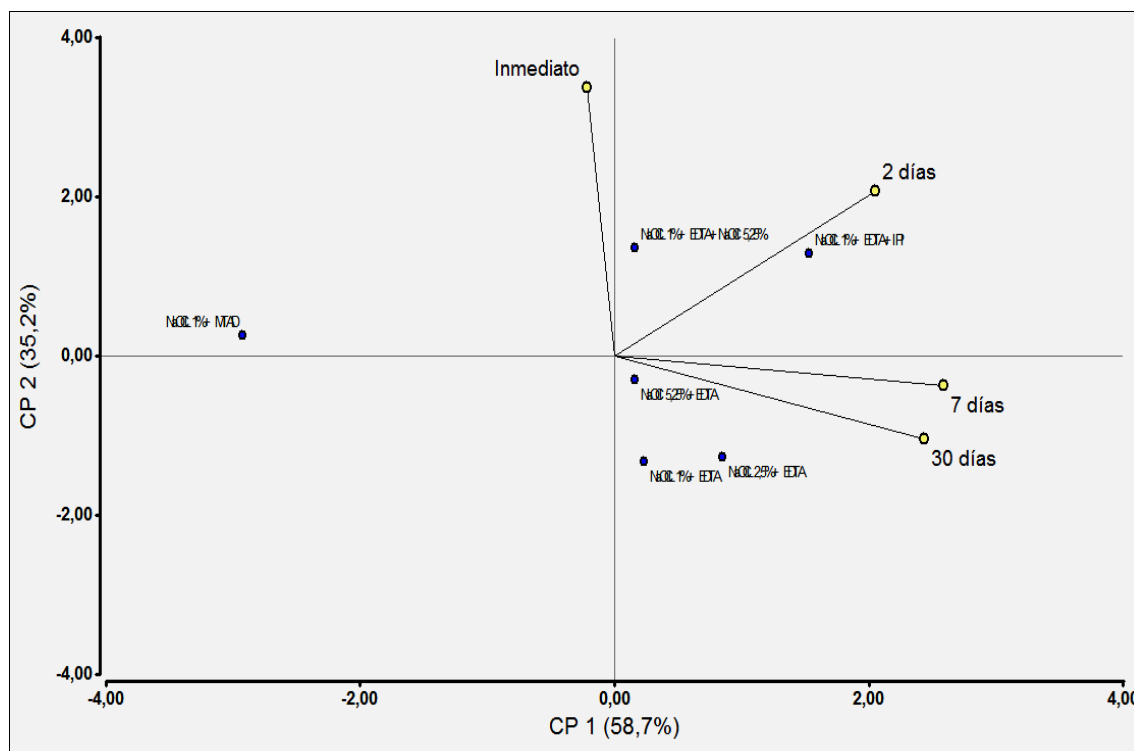


Fig. 44: Análisis de componentes principales. Gráfico Biplot (variables- irrigantes y observaciones- inmediato, 2, 7 y 30 días)

La Figura 45 representa el análisis de Cluster donde se identifica el agrupamiento natural de las observaciones. Se aplican varios algoritmos de agrupamiento. Para ello observamos que la correlación cofenética es alta, lo cual indica que el conglomerado describe mejor el agrupamiento natural de los datos. Se examinan relaciones de interdependencia y separa grupo NaOCl 1% + MTAD de todos los otros clusters. En detalle se puede ver que coincide con el análisis anterior habida cuenta que también agrupa los irrigantes con valores similares.

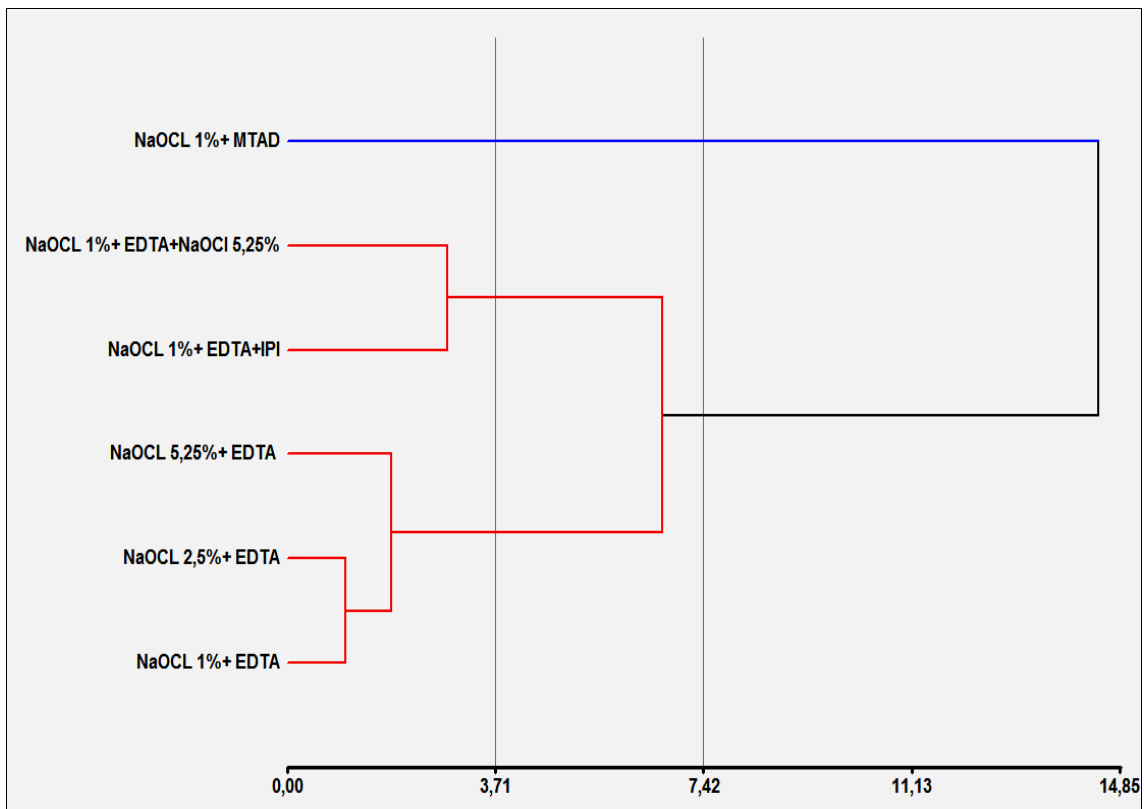


Fig. 45: Análisis de Cluster. Correlación cofenética = 0,945

## ESTUDIO 2: EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DENTINARIA A *E. faecalis* EN DOS GRUPOS ETARIOS.

El control de permeabilidad dentinaria a *E. faecalis* efectuado diariamente durante 7 días y luego a los 30 días, mostró que en el primer día, el grupo A reveló un 44% de casos de permeabilidad positiva, incrementándose progresivamente hasta el quinto día. Desde el quinto día hasta el séptimo día se mantuvo estable, alcanzando el 100% a los 30 días. En el grupo B los primeros casos positivos (11%) se detectaron en el segundo día, aumentando progresivamente hasta el sexto día. A los 30 días el porcentaje positivo alcanzó el 78% de los casos (Tabla 15).

Grupo	Diente	Días							
		1	2	3	4	5	6	7	30
A	1	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	-	-	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	-	-	-	-	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	-	-	+	+	+	+	+	+
	Porcentaje	44%	56%	67%	78%	89%	89%	89%	100%
B	10	-	-	-	+	+	+	+	+
	11	-	-	-	-	-	+	+	+
	12	-	-	+	+	+	+	+	+
	13	-	-	-	-	-	-	-	+
	14	-	-	-	-	+	+	+	+
	15	-	+	+	+	+	+	+	+
	16	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	+
	18	-	-	-	-	-	-	-	-
	Porcentaje	0%	11%	22%	33%	44%	56%	56%	78%

Tabla 15: Estudio cualitativo de la permeabilidad dentinaria a *E. faecalis*. Porcentajes de casos positivos en los grupos A y B.

En la Figura 46 se observa un trazado lineal del porcentaje de casos positivos a lo largo del tiempo en los dos grupos etarios. Contrastando los grupos A y B mediante un test no paramétrico para muestras relacionadas, prueba de Wilcoxon, la diferencia estadística fue significativa.

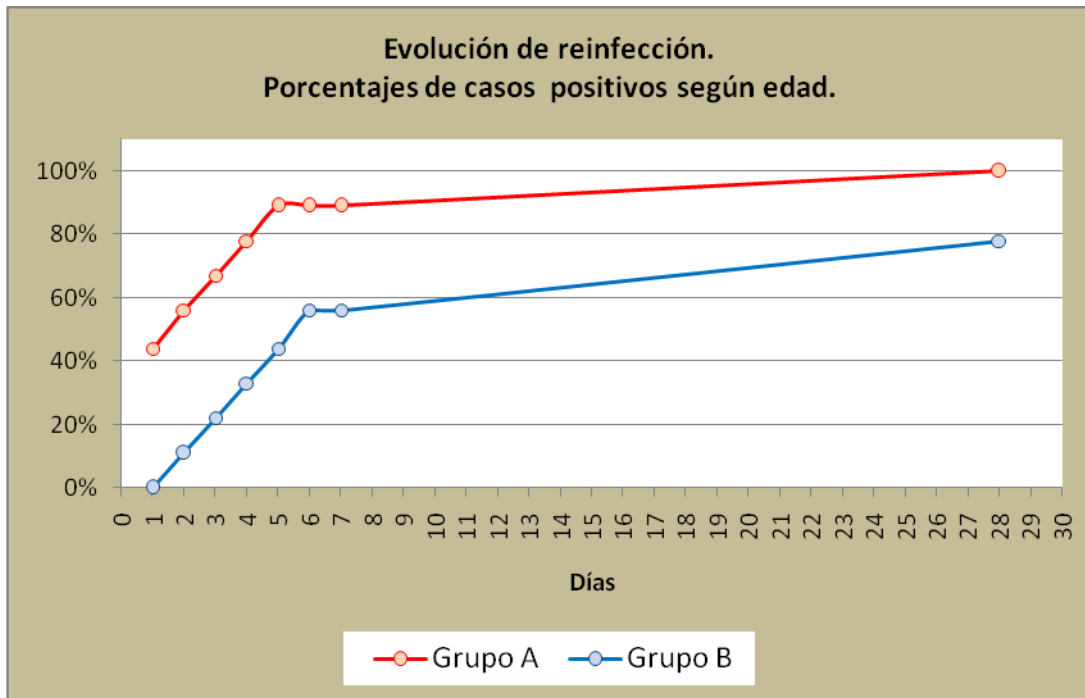


Fig. 46: Curvas evolutivas de los porcentajes de casos positivos en los Grupos A y B, durante 7 días y a los 30 días.

La Figura 47 muestra las mediciones del espesor de dentina de los cortes transversales de la raíz desde el piso de la cavidad externa hasta la pared del conducto.

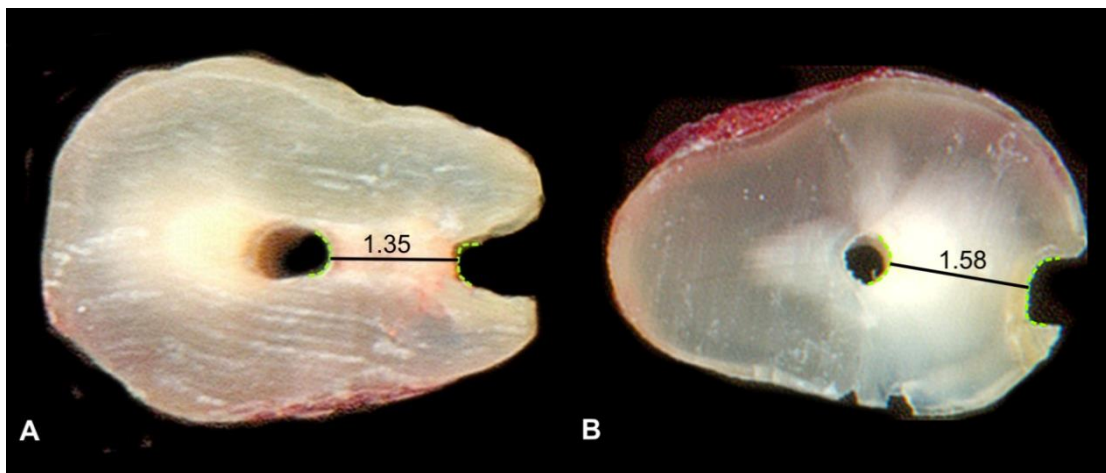


Fig. 47: Mediciones del espesor de dentina en ambos grupos etarios (A y B).

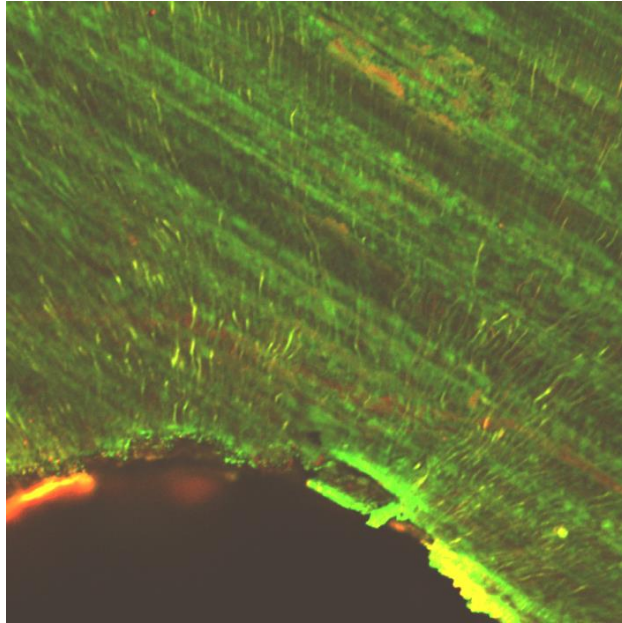
La Tabla 16 muestra los registros de las mediciones del espesor de dentina, los cuales mostraron un valor promedio de 1.36 mm con un rango de 0.70 a 2.01mm.

Grupo A		Grupo B	
Muestra	Espesor (mm)	Muestra	Espesor (mm)
1	1,63	10	1,98
2	1,40	11	1,67
3	1,11	12	1,10
4	1,72	13	1,58
5	1,58	14	2,01
6	1,35	15	1,35
7	0,70	16	0,77
8	0,77	17	1,12
9	1,38	18	1,33
<b>Promedio</b>	<b>1,29</b>	<b>Promedio</b>	<b>1,43</b>
DS	0,37	DS	0,41
Mín.	0,70	Mín.	0,77
Máx.	1,72	Máx.	2,01
<b>Promedio Gral.: 1,36 mm</b>			

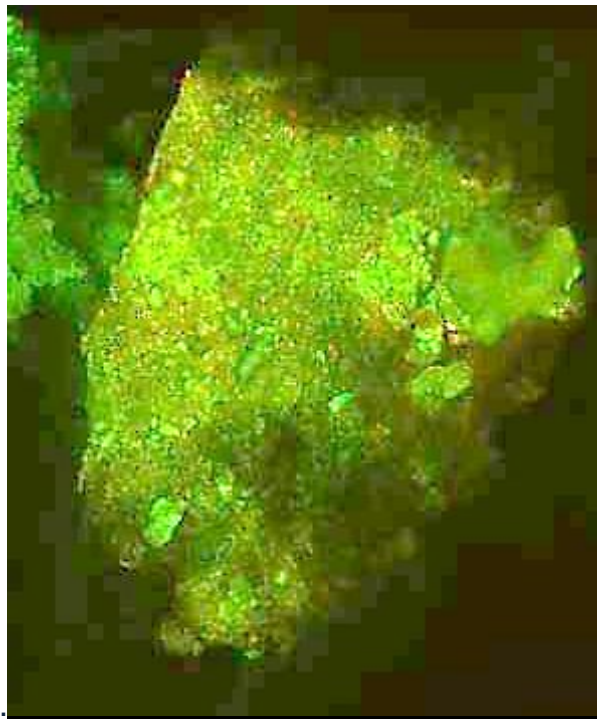
Tabla 16: Valores de espesor de dentina correspondientes a los grupos A y B

## 2 A.-Evaluación de la infección de los conductos con Microscopio CONFOCAL

Una vez finalizado el estudio de la permeabilidad dentinaria, se seleccionaron 2 caninos con controles positivos, uno de cada grupo etario, para ser analizados con el Microscopio CONFOCAL. A la altura de la cavidad tallada en la superficie externa de la raíz se observó biofilm bacteriano en la dentina. Las bacterias presentaron formas de cocos, sugiriendo la presencia de *E. faecalis*, interconectadas en una matriz extracelular, formando una estructura tridimensional (Figs. 48 y 49).



**Fig. 48:** Canino #1 del grupo A. Luz del conducto, pared dentinaria, túbulos dentinarios. Se observan células bacterianas en dentina (rojo).



**Fig.49:** Canino #15 del grupo B. Células bacterianas (rojo)



## DISCUSIÓN

La desinfección de los conductos radiculares ha sido motivo de estudio de numerosos investigadores que utilizaron diferentes estrategias antimicrobianas incluyendo instrumentación del conducto radicular, uso de soluciones irrigantes y obturación de los conductos radiculares; mostrando resultados controvertidos. Esto se debe fundamentalmente a las reconocidas limitaciones de los estudios de bacterias en cultivos planctónicos, cuyos resultados difieren de aquellos realizados sobre biofilm bacterianos; más aún cuando se intenta reproducir *in vitro* la formación del biofilm en los conductos radiculares (Estrela y col 2009).

Las investigaciones de Haapasalo y Orstavik (1987), Kishen y col (2006), Duggan y col (2007) y Estrela y col (2009), en una revisión crítica sobre los modelos de estudios antimicrobianos han puesto en evidencia que aún no se ha establecido consenso en cuanto a un modelo experimental estandarizado para la formación de biofilm, lo cual dificulta la comparación de resultados entre diferentes estudios y su traslado a las prácticas clínicas.

Para realizar un estudio "*in vitro*" sobre desinfección del conducto radicular, es necesario contar antes con un adecuado modelo de infección, que asegure el desarrollo bacteriano en el conducto radicular y evite falsos resultados.

A partir del modelo de infección de bloques dentinarios bovinos, presentado por Haapasalo y Orstavik (1987), en el que previo a infectarlos aplicaron NaOCl al 5,25% seguido de EDTA al 17%; autores como Safavi y col (1990), Peters y col (2000) entre otros, comenzaron a utilizar ambas soluciones para eliminar el barro dentinario antes de inocular la bacteria. Este procedimiento facilita la penetración de los gérmenes a lo largo de los túbulos dentinarios.

En el presente estudio se empleó NaOCl seguido de EDTA y tiosulfato de sodio, tal como lo proponen Siqueira y col (2010) para facilitar la infección de los conductos, no sólo porque remueve el barro dentinario, sino además, por la acción inhibitoria que esta última sustancia tiene sobre el efecto residual del NaOCl, como lo demostraran los autores anteriormente citados, quienes utilizaron tiosulfato de sodio al 10% durante 5 minutos, antes de la infección con *E. faecalis*.

La acción selectiva del EDTA para remover el componente inorgánico de la dentina, expone las fibras colágenas, creando un sustrato ideal para la adhesión de *E. faecalis*, como fue demostrado por Haapasalo y col (2007), Kishen y col (2008) Nallapareddy y col (2000).

En el presente estudio, la infección de los conductos radiculares fue mayor en el grupo A, de dientes menores de 25 años, que en el grupo B, de dientes mayores de 50 años, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,004$ )

Asimismo, Ozdemir y col (2010) observaron que el número de células de *E. faecalis* fue significativamente más bajo en el grupo adulto comparado con el joven, cuando estudiaron tres formas diferentes de acondicionar la dentina antes de la infección. Ellos sostienen que el uso de NaOCl seguido de EDTA, como irrigante final fue más efectivo que el NaOCl y el EDTA por separado, para favorecer la adhesión de *E. faecalis* a la dentina.

Por su parte, Haapasalo y Orstavik (1987), Safavi y col (1990) y Peters y col (2000) también tuvieron en cuenta el factor de la edad, al seleccionar para su estudio bloques dentinarios bovinos; ya que los dientes provenían de un grupo de animales de la misma edad.

En el presente estudio, donde se evaluó la permeabilidad de la dentina a *E. faecalis*, en dientes de edades conocidas, se removió una porción del cemento radicular, para favorecer el pasaje de las bacterias a través de los túbulos dentinarios desde el conducto radicular hacia la superficie externa de la raíz, ya que Peters y col (2000) observaron que los microorganismos penetran hasta una zona limitada de la dentina, si está presente el cemento radicular.

Por otro lado, se observó que el pasaje de *E. faecalis* a través de los túbulos dentinarios fue más rápido en dientes jóvenes que en adultos, logrando la infección del 100% de las muestras en el grupo A, a los 30 días; mientras que en el grupo B, de dientes adultos, sólo el 78% se infectaron en el mismo período de tiempo.

Estos resultados coinciden con los hallados por Kakoli y col (2009) quienes observaron, mediante un estudio histológico, que el número de túbulos dentinarios infectados y la profundidad de penetración bacteriana fue significativamente mayor en los dientes jóvenes que en los adultos.

Nazari y col (2009) observaron que con la edad, las fibras colágenas pierden su extensibilidad y disminuye el contenido colágeno de la dentina, con lo cual habría menos sustrato para la adhesión bacteriana en los dientes adultos.

Tales hallazgos sugieren que la infección bacteriana de los túbulos dentinarios en dientes adultos presenta menor extensión en profundidad, lo cual soporta nuestros resultados. Esto podría explicarse por la presencia de túbulos dentinarios escleróticos en la dentina adulta, por un aumento de la dentina peritubular, disminuyendo el número de túbulos dentinarios abiertos.

La diferencia en el número de túbulos dentinarios infectados podría ser clínicamente importante ya que influye en la habilidad de la dentina para alojar

bacterias durante la etapa de infección, y la eficacia de los procedimientos clínicos para desinfectar los mismos.

En el presente estudio, donde evaluamos el efecto inmediato de los distintos irrigantes, en conductos radiculares infectados con *E. faecalis* observamos que el recuento de bacterias del conducto, luego de la irrigación, fue menor en dientes adultos. Estos resultados, sin considerar la infección inicial del conducto, podrían sugerir que el irrigante fue más efectivo en dientes adultos; sin embargo, podría deberse a que inicialmente había menos bacterias en los conductos de dichos dientes.

Orstavik y col (2004) sostienen que la reducción progresiva de la luz del conducto y sus ramificaciones con la edad limita el volumen disponible para la infección, lo cual facilitaría una adecuada desinfección del conducto. Estos resultados, junto a los hallazgos de Fouad y col (2003) explicarían por qué la tasa de éxito del tratamiento endodóntico es mayor en los individuos adultos, quienes observaron que en pacientes mayores de 60 años el número de bacterias residuales en el conducto fue menor que en pacientes jóvenes, resultando en una disminución de la radiolucidez periapical.

Por otra parte, Shen y col (2011) estudiaron el impacto que el tiempo de formación y maduración del biofilm tiene sobre la eficacia de clorhexidina sobre *E. faecalis*, y observaron que la bacteria fue más resistente en los biofilms más maduros.

Stojcic y col (2013) demostraron que NaOCl al 1%, IPI al 0,2/0,4% y clorhexidina al 2% fueron efectivos para inhibir las bacterias en un biofilm de 1 y 2 semanas de desarrollo; mientras que las bacterias de un biofilm de 3 a 8 semanas resultaron más resistentes a los mismos agentes antimicrobianos. Las diferencias en el porcentaje de bacterias muertas entre los diferentes irrigantes fueron mayores en los biofilms de menor tiempo de formación que en los más maduros.

Estos resultados demuestran que en aquellos estudios en los que se utilizan biofilms no maduros, para estudiar la eficacia de los agentes desinfectantes, los resultados pueden ser muy estimulantes y alentadores, siendo que la situación podría estar alejada de la realidad, ya que la mayoría de las infecciones endodónticas y periodontales, *in vivo*, son consecuencia de la acción de biofilms de largos períodos de formación.

Por tal motivo, es importante utilizar biofilms maduros cuando se evalúa la eficacia antibacteriana de irrigantes endodónticos. En el presente estudio el período de incubación de los premolares infectados con *E. faecalis* fue de 60 días, al cabo de los cuales se observó, mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), la formación de biofilm bacteriano sobre la pared del conducto radicular, con profunda penetración en los túbulos dentinarios.

Orstavik y col (1991) y Soares y col (2006) observaron que la desinfección del conducto radicular depende de la técnica de instrumentación, el ensanchamiento del mismo, la naturaleza química de los irrigantes y la susceptibilidad de los microorganismos.

Por tal motivo, en el presente estudio, se usó en todos los casos, el sistema rotatorio ProTaper Universal, ensanchando el conducto hasta el instrumento F3; y el volumen del irrigante fue el mismo en todos los grupos de estudio, sin considerar el régimen de irrigación; ya que un irrigante es efectivo no sólo por sus propiedades químicas, sino también por su efecto físico-mecánico de arrastre de la solución.

El grupo que presentó mejor efecto antimicrobiano inmediato frente a *E. faecalis*, fue NaOCl 1% + EDTA + IPI, seguido de NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25% e NaOCl 1% + MTAD . En cuarto lugar, se ubicó el grupo NaOCl 5,25% + EDTA; en quinto lugar NaOCl 2,5% + EDTA y finalmente NaOCl 1% + EDTA. En el presente estudio inmediato, se observó que la irrigación final con una solución antiséptica o antibiótica, luego de la preparación quimomecánica y el uso del EDTA, aumentó la desinfección del conducto.

En los grupos donde se realizó la irrigación final del conducto con una solución antibacteriana como MTAD, IPI e NaOCl 5,25%, luego de irrigar con EDTA, la concentración del NaOCl durante la instrumentación fue del 1%, utilizando una concentración baja de NaOCl para no interferir con el efecto antimicrobiano del irrigante final.

Cabe destacar, que la reducción bacteriana fue menor cuando se usó NaOCl al 1% y 2,5% seguido de EDTA, sin usar una solución antimicrobiana en la irrigación final.

Arias-Moltz (2008) observaron que si bien el EDTA no es bactericida, al remover el barro dentinario no sólo elimina las bacterias contenidas en él sino que deja abiertos los orificios de entrada a los túbulos, permitiendo una mejor penetración del irrigante a través de los túbulos dentinarios; como ya había sido demostrado por Zehnder y col (2005), Dai y col (2011) y Adiguzel y col (2011).

Ya ha sido demostrado por numerosos investigadores, entre ellos, Soares y col (2010), Zehnder y col (2006), Siqueira y col (2000), Baumgartner y Mader (1987), que el uso alternado de NaOCl, EDTA y nuevamente NaOCl es altamente efectivo sobre *E faecalis*, ya que al remover el barro dentinario se eliminan las bacterias presentes en él.

Sin embargo, el uso de NaOCl al 5,25% luego del EDTA produce erosión dentinaria, por su propiedad de disolución del colágeno de la matriz dentinaria (Oyarzun y col 2002), el cual habría quedado expuesto luego de la acción quelante del

EDTA, alterando las propiedades físicas de la dentina (Mai y col 2010, Qian y col 2011).

El uso de otras soluciones antibacterianas tales como IPI y MTAD podrían considerarse como una alternativa para la irrigación final, ya que no disuelven el colágeno de la dentina, manteniendo una fuerte acción antimicrobiana. Sin embargo, la desventaja de estos compuestos es la pigmentación de la dentina por contener yodo (Schafer y col 2007) y tetraciclina en su composición.

En el presente estudio se seleccionaron NaOCl, IPI y MTAD porque presentan diferentes mecanismos de acción antimicrobiana. Winter y col (2008) demostraron que NaOCl ataca las proteínas produciendo un shock de calor de los microorganismos lo cual lleva a las bacterias a aglutinarse y eventualmente a morir. Gottardi y col (1983) demostraron que IPI involucra varios efectos celulares comprometiendo a las proteínas, nucleótidos y ácidos grasos; y el MTAD es una solución de un antibiótico, doxiciclina, derivado de la tetraciclina.

En el presente estudio, de los grupos donde se usó sólo NaOCl, el más efectivo fue la concentración al 5,25 %, cuando se usó 4 ml de esa concentración al finalizar la instrumentación, durante la cual se había irrigado con 7 ml de NaOCl al 1%. Pero también fue altamente efectivo cuando se usó 7 ml de NaOCl al 5,25 % durante la instrumentación. Si bien entre ambos grupos donde se usó NaOCl al 5,25 %, las diferencias no fueron estadísticamente significativas; los grupos de NaOCl al 1% y al 2,5% revelaron diferencias significativas respecto a los grupos de NaOCl al 5,25%.

Estos resultados coinciden con los hallados por Siqueira y col (2005), Metzger y col (2007) y Retamozo y col (2010), quienes observaron que el régimen de irrigación más efectivo para remover *E. faecalis* de cilindros dentinarios bovinos infectados fue NaOCl al 5,25 %, mientras que NaOCl al 1,3% y 2,5% fueron inefectivos en el mismo período de tiempo.

Además, Siqueira y col (2006), quienes infectaron dientes humanos con *E. faecalis*, demostraron que con NaOCl, las bacterias disminuyeron significativamente pero no fueron eliminadas completamente del conducto radicular.

Contrariamente a estos hallazgos, Haapasalo y col (2000) observaron que en ausencia de polvo dentinario, el NaOCl al 1% inhibe el desarrollo de *E. faecalis* en menos de 5 minutos.

Por otro lado, Gomes y col (2001), usando placas con cultivos celulares, encontraron que el crecimiento de *E. faecalis* fue inhibido con NaOCl al 0,5% luego de 30 minutos de contacto y se redujo a 30 segundos cuando se usó NaOCl al 5,25%.

La diferencia entre los resultados de estos estudios, se debe fundamentalmente a los efectos inhibitorios de la dentina, demostrado por Haapasalo y col (2000); y a la

interacción entre el irrigante y la bacteria, en la cual el irrigante no sólo elimina a la bacteria sino que a su vez, éste es debilitado por la masa celular de bacterias vivas y muertas en contacto con el irrigante, como ya había sido demostrado anteriormente por Haapasalo y col (1990).

En nuestro estudio, el recuento de UFC/ml residuales en el conducto, luego de usar BioPure MTAD fue similar al grupo donde se usó NaOCl al 5,25 % + EDTA. Estos hallazgos concuerdan con los resultados observados por Kho y Baumgartner (2006) quienes compararon la eficacia antimicrobiana de NaOCl al 1,3%/ Biopure MTAD frente a NaOCl al 5,25%/ EDTA al 15% y encontraron que no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

Estudios previos sobre la acción antibacteriana del BioPure MTAD revelaron resultados controvertidos. Por un lado, Shabahang y Torabinejad (2003) encontraron que la combinación de NaOCl al 1,3% como irrigante del conducto seguido de una irrigación final con BioPure MTAD fue más efectivo sobre *E. faecalis*, que el NaOCl al 5,25% seguido de EDTA al 17%. Sin embargo, Dunavant y col (2005) quienes compararon diferentes irrigantes, encontraron que NaOCl al 6% y al 1% fueron significativamente más efectivos sobre biofilms de *E. faecalis* que Smear Clear, REDTA y Biopure MTAD.

Ruff y col (2006) y Johal y col (2007) encontraron que no hubo crecimiento de *E. faecalis* en los conductos irrigados con NaOCl al 5,25%/ EDTA al 15%, mientras que el 50% de los conductos irrigados con NaOCl al 1,3%/ Biopure MTAD demostró crecimiento bacteriano, con diferencias estadísticamente significativas.

En el presente estudio, realizado en dientes humanos extraídos, observamos que con ningún irrigante se logró eliminar totalmente *E. faecalis* del conducto radicular. Trabajar en dientes humanos extraídos, implica tener en cuenta algunos factores que reducen la efectividad de los irrigantes, como es, además de la misma dentina, el tiempo de contacto entre irrigante/bacteria y el alcance de la irrigación, difícil de llegar a la profundidad de túbulos dentinarios.

Los hallazgos de cultivos negativos inmediatos a la irrigación, no necesariamente implica una completa erradicación de la bacterias. Las concentraciones bacterianas más bajas que el límite de detección del método de cultivo, podrían interpretarse como falsos negativos, como fue observado por Fabricius y col (2006) y Molander y col (2007).

Siqueira y col (2002) y Liang y col (2009) observaron que la recolonización generalmente ocurre en un período de tiempo posterior a la instrumentación, dependiendo de diversos factores, entre ellos el número de UFC residuales y la disponibilidad de nutrientes

Figdor y col (2003) y Kvist y col (2004) demostraron además, que *E. faecalis* tiene la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas, en una fase de crecimiento estacionaria, donde la densidad celular se mantiene estable sin aporte de nutrientes, por un largo período de tiempo. Pero la misma bacteria, en un medio favorable, vuelve a reproducirse.

Si bien en el presente estudio inmediato, la irrigación final con BioPure MTAD fue altamente efectiva; a partir de los 2 días se observó una marcada reinfección del conducto hasta los 7 días, incrementándose el crecimiento bacteriano a los 30 días.

Por el contrario, observamos que IPI presentó un alto poder antimicrobiano no sólo inmediatamente, luego de la irrigación, sino que esa reducción bacteriana se mantuvo estable en el tiempo, a los 30 días.

En los grupos donde se usó NaOCl al 1% y 2,5% durante la instrumentación seguido de una irrigación final con EDTA se observaron resultados similares al grupo de NaOCl 1% + EDTA + IPI en los controles a distancia, lo cual no reveló reinfección del conducto a los 30 días. Con NaOCl 1% + EDTA se observaron cultivos negativos a los 7 días.

Por el contrario, cuando se usó NaOCl al 5,25 % + EDTA, e NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25% se observó que luego de una marcada reducción bacteriana inmediata, el porcentaje de reducción microbiana se mantuvo a los 2 y 7 días, pero disminuyó significativamente a los 30 días. En ambos grupos donde se usó NaOCl al 5,25% hubo reinfección del conducto a los 30 días. El estudio realizado por Soares y col (2010) reveló resultados similares en un control microbiológico a los 14 días.

Por su parte, Baca y col (2011) estudiaron el efecto residual de la irrigación final y observaron que la mezcla de clorhexidina y cetramida inhibió la recontaminación bacteriana del conducto más efectivamente que el NaOCl al 5%. Si bien ellos observaron que con NaOCl al 5% obtuvieron cultivos negativos en los controles inmediatos, a partir del quinto día los cultivos fueron positivos en todas las muestras, coincidiendo con nuestros resultados. Asimismo, Weber y col (2003) demostraron que NaOCl no posee acción residual.

Dentro de las limitaciones del presente estudio *in vitro*, nuestros hallazgos microbiológicos, corroborados con Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopio CONFOCAL Laser, han demostrado que la edad de las piezas dentarias influyó en la infección inicial del conducto radicular y túbulos dentinarios, sin embargo, no tuvo ninguna incidencia en la desinfección de las mismas. La combinación de NaOCl y EDTA durante la instrumentación redujo significativamente el biofilm de *E. faecalis*, pero no eliminó totalmente las bacterias del conducto radicular. Estas bacterias residuales, adheridas a las paredes dentinarias, fueron las responsables de la

reinfección del conducto a los 30 días. La irrigación final del conducto con una solución antimicrobiana, una vez finalizada la preparación químico-mecánica, aumentó considerablemente la desinfección del mismo.

Por lo anteriormente expresado, resulta importante considerar las propiedades de cada uno de los irrigantes y analizar la situación clínica en particular para seleccionar un adecuado régimen de irrigación.



## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio se observó que:

- En la infección experimental de los conductos radiculares con *E. faecalis*, el acondicionamiento previo con hipoclorito de sodio, EDTA y tiosulfato de sodio permitió la limpieza de las paredes dentinarias y la penetración de las bacterias en los túbulos dentinarios.
- La formación de biofilm maduro de *E. faecalis* sobre las paredes dentinarias y en la profundidad de los túbulos dentinarios se hizo evidente luego de 60 días de incubación.
- La edad de las piezas dentarias influyó sobre la infección inicial de los conductos radiculares, ya que el recuento de UFC/ml fue mayor en los especímenes menores de 25 años que en los mayores de 50 años,
- Dentro de un plazo preestablecido de 30 días, la permeabilidad dentinaria al pasaje de *E. faecalis* a través de los túbulos fue del 100% en muestras menores de 25 años, mientras que en las mayores de 50 años, sólo el 78% de las piezas dentarias fue permeable al pasaje bacteriano
- Todos los protocolos de irrigación experimentados en este estudio fueron efectivos para reducir el número de UFC/ml de *E. faecalis* en el conducto radicular, aun cuando las bacterias no fueron erradicadas totalmente en ningún grupo.
- La reducción bacteriana observada después de la instrumentación e irrigación del conducto radicular, fue mayor cuando luego de usar EDTA, se realizó una irrigación final con una solución antiséptica.
- En el control bacteriológico inmediato el protocolo de irrigación más efectivo fue NaOCl 1% + EDTA + IPI. En orden decreciente le siguieron: NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25%; NaOCl 1% + MTAD; NaOCl 5,25% + EDTA; NaOCl 2,5% + EDTA e NaOCl 1% + EDTA.

- El alto porcentaje de reducción bacteriana observado inmediatamente después de irrigar con NaOCl 1% + EDTA + IPI, se mantuvo estable a lo largo del tiempo. A los 30 días no hubo reinfección de los conductos radiculares.
- El empleo de NaOCl 1% + MTAD mostró una marcada reducción bacteriana inmediata, sin embargo, a los 2 días se observó un incremento en el desarrollo de *E. faecalis* y reinfección a los 30 días.
- Si bien con NaOCl al 1% + EDTA e NaOCl 2,5% + EDTA la reducción bacteriana inmediata fue menor que con NaOCl 5,25% + EDTA; a los 30 días ambas soluciones no evidenciaron reinfección tal como se observó con NaOCl 5,25% + EDTA.
- En el control bacteriológico a los 2 días NaOCl 1% + EDTA + IPI e NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25% revelaron un alto porcentaje de reducción bacteriana; siguiéndole en efectividad decreciente: NaOCl 1% + EDTA, NaOCl 5,25% + EDTA; NaOCl 2,5% + EDTA e NaOCl 1% + MTAD.
- A los 7 días, el control bacteriológico reveló que NaOCl 1% + EDTA e NaOCl 2,5% + EDTA fueron más efectivos que NaOCl 1% + EDTA + IPI. Le siguieron en orden decreciente NaOCl 5,25% + EDTA; NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25% y finalmente NaOCl 1% + MTAD
- A los 30 días, los grupo NaOCl 1% + EDTA + IPI e NaOCl 2,5% + EDTA revelaron el mayor porcentaje de reducción bacteriana, siguiéndole en efectividad decreciente NaOCl 1% + EDTA; NaOCl 5,25% + EDTA; NaOCl 1% + EDTA + NaOCl 5,25% y finalmente NaOCl 1% + MTAD.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adiguzel O, Yigit Ozer S, Kaya S, Uisal I, Ganidagli- Ayaz S, Akkus Z (2011). Effectiveness of EDTA and MTAD on debris and smear layer removal using a self-adjusting file. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112: 803-808.
- Arias –Molitz MT, Ferrer Luque CM, Espigares –García M, Baca P (2008). *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod* 35:711-714.
- Azuero M, Herrera C (2003). Irrigantes de uso endodóntico. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 1.
- Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM (2011). Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *J Endod* 37:1121-1123.
- Baumgartner JC, Cuenin PR (1992). Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 18:605-12.
- Baumgartner JC, Mader CL (1987). A SEM evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod* 13: 147-157.
- Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T (1999). Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod* 25:413- 418.
- Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M (2003). Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod* 29: 334-337.
- Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G (1985). The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1:170-176.
- Bystrom A, Sundqvist G (1983). Bacteriologic evaluation of the effect of 0,5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy *O Surg O Med O Pathol* 1983;55:307-312.
- Byström A, Sundqvist G (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 18: 35-40.
- Bloomfield SF, Miles GA (1979). The antibacterial properties of sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol* 46: 65-73.

- Chang SI (1971). Modern concept of disinfection. J Sanit Eng Div Proc ASCE 97: 689-672.
- Clarkson RM, Moule AJ, Podlich H, Kellaway R, Mc Farlane R, Lewis D, Rowell J (2006). Disolution of porcine incisor pulps in sodium hypochlorite solutions of varying compositions and concentrations. Aus Dent J 51:245-251.
- Colak M, Eovil S, Bayindir Z, Yigit N (2005). The effectiveness of three instrumentation techniques on the elimination of *Enterococcus faecalis* from a root canal: an in vitro study. Journal of Contemporary Dental Practice 6: 1-7.
- Costa C, Edwards C, Hanks C (2001). Cytotoxic effect of cleansing solution recommended for chemical lavage of pulp exposure. Am J Dent 14: 25-30.
- Cunningham CJ, Senia ES (1993). A three-dimensional study of canal curvatures in the mesial roots of mandibular molars. J Endod 18:294-300.
- Cunningham W, Balekgian A (1980). Effect of temperature on collagen- dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 49:175-177.
- Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine B, Wimmer C, Gutmann J, Pashley D, Tay F (2011). The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. J Endod 37: 80- 84.
- De Souza EL, Ferraz CC, Gomes BP, Pinheiro ET, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ (2003). Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 96: 332-335.
- Distel JW, Hatton Jf, Gillespie MJ (2002). Biofilm formation in medicated root canals. J Endod 28: 676-686.
- Doyle MD, Gillespie WT, Loushine RJ, Weller RN, Mazzoni A, Waller JL, Pashley DH, Tay FR (2006). Improving the performance of EndoREZ root canal sealer with a dual-cured two-step self-etch adhesive. II. Apical and coronal seal. J Endod 32:766-770.
- Dugan J, Sedgley C (2007). Biofilm formation of oral and endodontic *E. faecalis*. J Endod 33: 815-818.
- Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL (2005). Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 32:527-531.
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002). Mechanisms involved in the resistance of *E. faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J 35: 221- 226.

- Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe O (1995). Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Bras Dent J* 6: 85-90.
- Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR (2009). Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. *J Appl Oral Sci* 17: 1-7.
- Fabricious L, Dalé G, Sundqvist G, Happonen RP, Moller AJ (2006). Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 114:278-285.
- Figdor D, Davies JK, Sunqvist G (2003). Starvation survival, growth and recovery of *E. faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 18: 234- 239.
- Frai S, Ng YL, Gulavibala K (2001). Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 34: 206-215.
- Franciosi Fabiana (2007). Evaluación in vitro del detrito impulsado a través del foramen como posible causante de la respuesta clínica posendodóntica. Tesis doctoral. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba.
- Fouad AF, Barry J, Caimano M (2002). PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 40: 3223- 3228.
- Fouad AF, Burlison J (2003). The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc* 34:43-51.
- Gani O, Visvisian C (1999). Apical canal diameter in the first upper molar at various ages. *J Endod* 25:689- 691.
- Geijersstam R, Ellington MG, Warner M, Woodford N, Haapasalo M (2006). Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lituania. *Oral Microbiol Immunol* 21:164-168.
- Giardino L, Pecora G, Ambu E, Savoldi E (2005). A new irrigant in the treatment of apical periodontitis : from research to clinic 12<sup>th</sup> Biennial Congress European Society of Endodontology, Dublin, September 15-17.

- Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M (2006). Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod* 32: 1091-1093.
- Goldberg F, Abramovich A (1977). Analysis of the effect of EDTA on the dentinal walls of the root canal. *J Endod* 3: 101-105.
- Goldberg F, Artaza L, Alfie D (2010). Capacidad de diferentes procedimientos de irrigación para la remoción del barro dentinario del orificio pulpar de conductos laterales simulados. *RAOA* 98:113-118.
- Goldberg F, Frajlich S (2001). ProTaper: nueva alternativa para la instrumentación mecanizada. *RAOA* 89:377-380.
- Gomes BP, Ferraz CCR, Viana, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001). In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the alimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 34:424-428.
- Gottardi W (1983). Iodine and iodine compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th edn. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 152-166.
- Gottardi W, Karl A (1991). Chlorine coatings on skin surfaces. II. Parameters influencing the coating strength. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 191:478-493.
- Haapasalo M, Ørstavik D (1987). In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 66: 1375-1379.
- Haapasalo M, Unni E, Zandi H (2005). Eradication of endodontic infection by instrumental and irrigation solutions. *Endodontic Topics* 10: 77-102.
- Haapasalo M, Kerosuo E, Lounatmaa K (1990). Hydrophobicities of human polymorphonuclear leukocytes and oral *Bacteroides* and *Porphyromonas* spp., *Wolinella recta*, and *Eubacterium yurii* with special reference to bacterial surface structures. *Scand J Dent Res* 98:472-48.
- Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T (2007). Effect of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 33: 917- 925.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004). Bacterial biofilms from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95-102.
- Harrison JW, Cvek TA, Baumgartner JC (1978). Analysis of clinical toxicity of endodontic irrigants. *J Endod* 4: 6-11.
- Hockett J, Dommisch J, Jhonson JD, Cohenca N (2008). Antimicrobial efficacy of

two irrigation techniques in tapered and non tapered canal preparation. An in vitro study. J Endod 34:1374-1377.

- Hulsmann M, Peters OA, Dummer PMH (2005). Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. Endod Topics 10: 30- 37.
- Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS (1994). Virulence of Enterococci. Clin Microbiol Rev 7: 462- 468.
- Johal S, Baumgartner JC, Marshal JG (2007). Comparison of the antimicrobial efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/ 15% EDTA for root canal irrigation. J Endod 33: 48-51.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965). The effects of surgical exposures of dental pulps in germ- free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 20: 340-346.
- Kakoli P, Nandakumar R, Romberg E, Arola D, Fouad A (2009). The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. J Endod 35: 78- 81.
- Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruk Sakorn S (2002). Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 94:746-752.
- Kho P, Baumgartner JC (2006). A comparison of the antimicrobial efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*. J Endod 32:652-625.
- Ketterl W (1983). Age-induced changes in the teeth and their attachment apparatus. Int Dent J 33:262-271.
- Kishen A, George S, Kumar R (2006). *Enterococcus faecalis* mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. J Biomed Mater Res A 77: 406-415.
- Kishen A, Sum C, Mathew S, Lim C (2008). Influence of irrigation regimens on the adherence of *E. faecalis* to root canal dentin. J Endod 34: 850- 854.
- Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, Murray BE, Nallapareddy SR, Gillespie MJ (2006). Enterococcus faecalis adhesion, ace, mediates attachment to particulate dentin. J Endod 32: 634-637.
- Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C (2004). Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. J Endod. 30:572- 576.

- Liang YT, Xia WW, Liang JP, Ma SF, Yan PF (2009). Quantitative evaluation of residual endodontic microorganisms after mechanical root canal preparation different chemical preparations by real-time PCR. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 18:10-14.
- Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoreto C, Boaretti M, Canepari P (2001). Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non culturable state. *J Appl Microbiol* 91: 1095-1102.
- Love RM, Jenkinson HF (2002). Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 171-177.
- Mc Donell G, Russell AD (1999). Antiseptics and disinfectants: activity action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12: 147-179.
- Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD (1984). Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endod* 10:477- 483.
- Mai S, Kim YK, Kim J, Yiu CK, Ling J, Pashley DH, Tay FR (2010). In vitro remineralization of severely compromised bonded dentin. *J Dent Res* 89:405-410.
- Metzger Z, Better H, Abramovitz I (2007). Immediate root canal disinfection with ultraviolet light: an ex vivo feasibility study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104:425-433.
- Miller WD (1894). An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* 36: 505- 509.
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998). Microbial status of root filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 31: 1-7.
- Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T (2007). Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. *J Endod.* 33:1145-1148.
- Molander A, Reit C, Dahlen G (1999). The antimicrobial effect of calcium hydroxide in root canals pretreated with 5% iodine potassium iodide. *Endod Dent Traumatol* 15: 205-209.
- Moller AJ (1966). Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies (thesis).* *Odontol Tidskr* 74 1-380.
- Moller AJ, Fabricious L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G (1981). Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 89: 475- 482.



- Molven O, Olsen I, Kerekes K (1991). Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 7:226-229.
- Munson MA, Pitt Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG (2002). Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 81: 761-767.
- Nagas E, Cehreli Z, Durmas V, Vaillitu P, Lassila L (2007). Regional push-out strength and coronal microleakage of Resilon after different light- curing method. *J Endod* 33: 1464-1468.
- Nallapareddy S, Qin X, Weinstok G, Hook M, Murray B (2000). *Enterococcus faecalis* adhesion, ace mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* 68: 5218-5224.
- Spanó C, Barbib E, Santos T, Guimaraes L, Pécora J (2001). Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and phisico-chemical properties of resulting liquid. *Braz Dent J* 12: 154-157.
- Nair H, Sjorgen V, Krey G, Kanberg KE, Sundqvist G (1990). Intrarradicular bacteria and fungi in root filled, asymptomatic human teeth with therapy resistant periapical lesion: A long term light and electron microscopic follow up study. *J Endod* 16: 580-588.
- Nazari A, Bajaj D, Zhang D, Romberg E, Arola D (2009). Aging and the reduction in fracture toughness of human dentin. *J Mech Behav Biomed Mater* 2: 550-559.
- Ohara PK, Torabinejad M (1993). Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol* 9: 95-100.
- Oyarzun A, Cordero AM, Whittle M (2002). Immunohistochemical evaluation of the effect of sodium hypochlorite on dentin collagen and glicosaminoglycans. *J Endod* 28: 152-156.
- Ørstavik D, Haapasalo M (1990). Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 6: 142-149.
- Orstavik J, Okita N, Orstavik D, Ostby K (1991). In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. *Dent Mater.* 7:155-160.

- Ørstavik D, Qvist V, Stoltze K (2004). A multivariate analysis of the outcome of endodontic treatment. *Eur J Oral Sci.* 112:224-230.
- Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D (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. *J Endod.* 36:842-846.
- Pascualini Carlos J (2010). Capacidad de sellado inmediato y a distancia de distintos materiales de obturación coronal. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba.
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M (2000). Isolation of *Enterococcus faecalis* in previous root filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 26: 593-595.
- Peciuliene V, Reynaud A, Balciuniene I, Haapasalo M (2001). Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 34: 429-434.
- Pecora JD, Savioli RN, Vansan LP, Gariba Silva R, Ferreira da Costa W (1986). A new method for making transparent teeth. *Rev Fac Odontol Ribeiro Preto* 23:62-65.
- Peters LB, Wesseling PR, Van Winkelhoff AJ (2002). Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J* 35: 698-702.
- Peters L, Wesselink P, Moorers W (2000). Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 33: 28-36.
- Peters OA, Laib A, Gohring TN, Barbakow F (2001). Changes in root canal geometry after preparation assessed by high resolution computed tomography. *J Endod* 27:1-6.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ (2003). Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 18:100-103.
- Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M (2005). The susceptibility of starved, stationary phase and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod* 31: 380- 386.

- Popescu IG, Popescu M, Man D, Ciolacu S, Georgescu M, Ciurea T, Aldea GS, Stancu C, Badea M, Ulmeanu V (1984). Drug allergy: incidence in terms of age and some drug allergens. *Med Interne*. 22:195-202.
- Qian W, Shen Y, Haapasalo M (2011). Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *J Endod*. 37:1437-1441.
- Rappe MS, Giovannoni SJ (2003). The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57: 369- 374.
- Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M (2010). Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 36:520-523.
- Ricucci D, Siqueira JF (2008). Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. *J Endod* 34:1124-1129.
- Rigden MD, Baier C, Ramirez-Arcos S, Liao M, Wang M, Dillon JA (2008). Identification of the coiled-coil domains of *Enterococcus faecalis* DivIVA that mediate oligomerization and their importance for biological function. *J Biochem* 144:63-76.
- Rocas IN, Siqueira JF (2008). Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol* 46: 3599- 3606.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr, Debelian GJ (2011). Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod* 37:1206-1212.
- Rocas IN, Siqueira JF, Santos KR (2004). Association of *E. faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 30: 315-320.
- Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS (2006). In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod* 32:331-333.
- Safavi K, Spangberg L, Langland K (1990). Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod* 16: 207-210.
- Saito D, de Toledo LR, Rodrigues JL, Tsai SM, Hofling JF, Goncalves RV (2006). Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol* 55: 101-106.

- Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF, Benno Y (2006). Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 21: 112-117.
- Sakamoto M, Siqueira JF, Rocas IN, Benno Y (2007). Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol* 22: 19-25.
- Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK (2005). Survival of *E. faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* 38:735-739.
- Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, Reit C, Molander A (2006). Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *E. faecalis* in root canals. *J Endod* 32: 173-178.
- Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS (1997). Growth patterns of *Candida Albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 84:68-75.
- Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS (1999). Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod* 25:235-238
- Shabahang S, Torabinejad M (2003). Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-contaminated root canals of extracted human teeth. *J Endod.* 29:576-579.
- Schäfer E, Zandbiglari T, Schäfer J (2007). Influence of resin-based adhesive root canal fillings on the resistance to fracture of endodontically treated roots: an in vitro preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 103:274-279.
- Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M (2011). Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 37: 657-661.
- Schilder H (1974). Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am* 18:269-296.
- Schilder H (1974). Postdoctoral endodontic education: curricular objectives. *J Dent Educ.* 38: 618-622.
- Siqueira JF, Alves FR, Almeida BM, de Oliveira JC, Rôças IN (2010). Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. *J Endod.* 36:1860-1865
- Siqueira JF, Rocas IN (2005). Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2- Redefining the endodontic microbiota. *J. Endod* 31: 488-498.

- Siqueira JF, Rocas IN (2007). Molecular detection and identification of *Synergistes* phylotypes in primary endodontic infections. *Oral Dis* 13: 398-404.
- Siqueira JF, Rocas IN, Favieri A, Lima KC (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5% and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 6: 331- 334.
- Siqueira JF, Rocas IN, Lopes HP, Elías CN, de Uzeda M (2002). Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod* 28: 770-776.
- Siqueira JF, Rocas IN, Rosado AS (2004). Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by the naturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol* 19: 363-369.
- Siqueira JF, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M (1998). Antibacterial effects of endodontic irrigants on black pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 24:414-416.
- Siqueira JF, de Uzeda M, Fonseca ME (1996). A SEM evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod* 22: 308- 312.
- Siqueira JF Jr, Sakamoto M, Rôças IN, Benno Y (2006). Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 21:112-122.
- Siqueira JF, Sen BH (2004). Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 97:632-641.
- Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN (1997). Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 30: 91-95.
- Soares JA, Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Ito IY (2006). Elimination of intracanal infection in dogs teeth with induced periapical lesions after rotary instrumentation: influence of different calcium hydroxide pastes. *J Appl Oral Sci*.14:172-177.
- Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonça RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Júnior M, Magalhães PP, Santos MH, de Macêdo Farias L (2010). Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 36: 894-898.

- Spangberg L, Engstrom B, Langeland K (1973). Biologic effect of dental J Endod 36:894-898. materials.3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 36: 856- 871.
- Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K (2001). An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates Int Endod J; 34:300-307.
- Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M (2013). Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. J Endod 39: 473-477.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 85:86- 92.
- Sundqvist G (1976). Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Odontological dissertation n° 7. University of Umea. Sweeden.
- Sundqvist G, Johanson E, Sjogren UT (1989). Prevalence of black pigmented Bacteroides species in root canal infections. J Endod 15:13-19.
- Sundqvist G (1992). Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol Immunol 7: 257-262.
- Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S (2003). The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. J. Endod. 29: 233-239.
- Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK (2002). Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 94:658-66.
- Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD (2003). The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. J Endod 29: 400-403.
- Tronstad L, Dahle UR, Olsen I (1993). Spirochaetes in oral infections. Endod Dent Traumatol. 9:87-94.
- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ (2004). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97: 79-84.
- Vianna ME, Horzs HP, Gomez BP, Conrads G (2006). In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root Canals containing necrotic pulp tissue. Int Endod J 39: 484-492.

- Walia HM, Brantley WA, Gerstein H (1988). An initial investigation of the bending and torsional properties of Nitinol root canal files. *J Endod* 14: 346- 351.
- Waltimo TM, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D (2005). Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 31: 863- 868.
- Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP (1999). In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 32: 421-429.
- Waltimo TM, Siren EK, Torokko HL, Haapasalo M (1997). Fungi in therapy resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 30: 96-101.
- Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M (2012). The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod* 38: 948-953
- Weine FS (1996). The use of non-ISO-tapered instruments for canal flaring. *Compend Contin Educ Dent*. 17:651-656.
- Williamson AE, Cardon JW, Drake DR (2009). Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 35:95-7.
- Winter J, Ilbert M, Graf PC (2008). Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* 135:691-701.
- Zhang W, Torabinejad M, Li Y (2003). Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *J Endod* 29: 654-657.
- Zehnder M (2006). Root canal irrigants. *J Endod* 32:389-98.
- Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T (2005). Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod*. 31:817-820.
- Zmener O (2010). Estado actual del hipoclorito de sodio en endodoncia: 1- Propiedades biológicas. *RAOA* 98:247-255.