

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología



EFFECTIVIDAD DE ANTISÉPTICOS EN LA ELIMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS POLIMICROBIANAS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

MARÍA BEATRIZ AGUADO PÉREZ

Bajo la dirección de las doctoras
Matilde Ruíz Linares y María Teresa Arias Molíz

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: María Beatriz Aguado Pérez
ISBN: 978-84-9163-447-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48118>



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



**Facultad de
Odontología**

De acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de Enero, los abajo firmantes informamos:

Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis doctoral titulada: **“EFECTIVIDAD DE ANTISÉPTICOS EN LA ELIMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS POLIMICROBIANAS”**, presentada por D^a M^a Beatriz Aguado Pérez, han sido realizados bajo nuestra supervisión y dirección y reúnen las condiciones académicas necesarias para optar al Grado de Doctor, si así lo considera el Tribunal designado por la Universidad de Granada.

En Granada, a veintiuno de Junio de dos mil diecisiete.

Fdo. Profa. Dra. D^a Matilde Ruíz Linares

Fdo. Profa. Dra. D^a M^a Teresa Arias Moliz

la Doctoranda

Fdo: M^a Beatriz Aguado Pérez

**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

El doctorando / The *doctoral candidate* [**MARÍA BEATRIZ AGUADO PÉREZ**] y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: [**MATILDE RUÍZ LINARES Y MARÍA TERESA ARIAS MOLÍZ**]

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / Place and date:



Director/es de la Tesis / *Thesis supervisor/s*;

Doctorando / *Doctoral candidate*:

Firma / Signed

Firma / Signed

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada durante los años 2013-2017, dentro del Grupo de Investigación “Microbiología, Inmunología, Epidemiología y Prevención de las Enfermedades Bucodentales” CTS 167.

La Doctoranda ha disfrutado de un contrato como personal de apoyo técnico a la investigación, durante los meses de Febrero a Septiembre del año 2015, bajo la dirección de Profa. D^a María Pilar Baca García.

Agradecimientos

Ha sido un largo camino el que ha dado como fruto esta Tesis Doctoral, y son muchas las personas a las que quiero agradecer su ayuda y apoyo.

Quiero agradecerle profundamente a mi directora, la Profa. Matilde Ruíz Linares, que desde un primer momento me abriera las puertas del grupo y me diese la oportunidad que he tenido. Gracias a ella este trabajo ha salido adelante y ha sido posible su culminación. Su ejemplo de trabajo, generosidad, lucha y tesón no sólo en la investigación, sino también a nivel clínico y personal, ha sido y será siempre un referente para mí.

A mi directora la Profa. Teresa Arias Molíz, de la cual he recibido un gran apoyo y ayuda incondicional a nivel investigador y profesional. Gracias por tener siempre unas palabras de aliento en todo este tiempo.

A las profesoras Pilar Baca García y Carmen María Ferrer Luque, que junto con mi dirección han aportado su gran experiencia, orientación y apoyo, gracias por haber confiado en mí para el desarrollo del contrato predoctoral.

Gracias a todas las personas que desde su puesto técnico hacen posible que los doctorandos puedan sacar adelante sus trabajos, no sería posible sin el trabajo y ayuda de todas ellas. En estas líneas quiero dar mi más sincero agradecimiento a Francisca Castillo Pérez y a Yudi Gómez Villaescusa, son parte fundamental del equipo, hacen que todo funcione en el laboratorio y es un verdadero lujo poder trabajar a su lado, no sólo por la experiencia tan enriquecedora a nivel profesional que aportan, su humanidad y el cariño que me han brindado, me ha dado la fuerza que he necesitado en todo momento. Muy especialmente quiero agradecer a Ana Santos Carro, su incalculable ayuda, disponibilidad y orientación. Ana, ha sido un verdadero privilegio trabajar contigo y más aún poder contar con tu amistad. A Rocío Márquez Crespo por su ayuda técnica, consejo y apoyo en todo este tiempo. A todas ellas, muchísimas gracias.

A Concepción Hernández Castillo, Gustavo Ortiz Ferrón y Ana Fernández Ibáñez, por su ayuda técnica en la parte experimental de este trabajo.

Mi agradecimiento a la disponibilidad siempre prestada por todo el personal de la biblioteca del Colegio Máximo de Cartuja. A Sergio Torres Ruíz por su ayuda y consejos de diseño.

Nada de esto hubiera sido posible sin la ayuda de mis padres y de mi hermana, que con el esfuerzo de todos ellos a lo largo de mi vida y de mi carrera profesional ha hecho posible que yo pueda ser afortunada por estar donde estoy.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo, por su apoyo y palabras de aliento. Especialmente a Ana y Manu, Hicham, Amanda, Silvia, José David, Lucía y Antonio, gracias por estar siempre ahí y ser la familia que se elige en la vida.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Cristina Benavides, Inmaculada Cabello y a la Profa. Fátima Aguilera, que también son un gran ejemplo de trabajo y tesón.

Fermín, esto también es gracias a ti, has sido ese motor que me ha impulsado todos los días a seguir hacia delante, me has dado toda tu ayuda, cariño, comprensión y apoyo incondicional, juntos hemos pasado por esta etapa, ha sido difícil, pero tu lucha en este campo ha sido un verdadero ejemplo para mí.

Índice

ÍNDICE	Páginas
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. MICROBIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN ENDODÓNTICA.....	9
2.1.1. Biopelículas microbianas como factor etiológico de la enfermedad pulpar y periapical.....	9
2.1.2. Infección del conducto radicular.....	17
2.2. SOLUCIONES ANTIMICROBIANAS EN ENDODONCIA.....	23
2.2.1. Hipoclorito de sodio.....	24
2.2.2. Clorhexidina.....	27
2.2.3. Alexidina.....	29
2.2.4. Ceftriaxona.....	30
2.3. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL.....	32
2.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES IRRIGADORAS FRENTE A BIOPELÍCULAS.....	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
3.1. PREPARACIÓN DE LOS ESPECÍMENES DENTINARIOS Y GRUPOS DE ESTUDIO.....	45
3.2. INÓCULOS MICROBIANOS PARA LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS....	48
3.2.1. Recogida de muestra microbiológicas.....	48
3.2.2. Medios de cultivo.....	49
3.2.3. Conservación de muestras microbiológicas.....	50
3.2.4. Validación de la viabilidad del inóculo microbiano.....	50
3.3. INFECCIÓN DE LA DENTINA Y FORMACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS.....	51
3.3.1. Validación de la viabilidad de la biopelícula polimicrobiana.....	52
3.4. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ANTIMICROBIANAS.....	52
3.5. TEST DE ACTIVIDAD FRENTE A BIOPELÍCULAS.....	53
3.6. ANÁLISIS MEDIANTE MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL.....	54
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	57

4. RESULTADOS	59
4.1. VALIDACIÓN DE LA MUESTRA MICROBIANA PARA LA INFECCIÓN DENTINARIA	61
4.2. VALIDACIÓN, CONTROL DE LA VIABILIDAD Y CARÁCTER POLIMICROBIANO DE LAS BIOPELÍCULAS FORMADAS EN DENTINA	63
4.2.1. Validación de la viabilidad de las biopelículas polimicrobianas.....	63
4.2.2. Validación del carácter polimicrobiano de las biopelículas.....	66
4.3. RESULTADO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES IRRIGADORAS SOBRE BIOPELÍCULAS POLIMICROBIANAS	67
4.3.1. Grupo control (agua destilada).....	68
4.3.2. Grupo hipoclorito de sodio al 2,5%.....	70
4.3.3. Grupo clorhexidina al 2%.....	72
4.3.4. Grupo cetrimida al 0,2%.....	74
4.3.5. Grupo alexidina al 2%.....	76
4.3.6. Grupo clorhexidina al 2% + cetrimida al 0,2%.....	78
4.3.7. Grupo alexidina al 2% + cetrimida al 0,2%.....	80
4.3.8. Comparación entre grupos.....	82
5. DISCUSIÓN	91
5.1. VALIDEZ INTERNA	93
5.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES IRRIGADORAS FRENTE A BIOPELÍCULAS POLIMICROBIANAS MADURAS	100
6. CONCLUSIONES	107
7. BIBLIOGRAFÍA	111
8. ANEXOS	125

Justificación y Objetivos

Actualmente está suficientemente confirmado que los microorganismos son el principal agente etiológico de la caries dental y los procesos pulpares y periapicales¹. Éstas son infecciones de naturaleza polimicrobiana, donde los microorganismos están organizados en estructuras de biopelículas. Una biopelícula o *biofilm* es una comunidad microbiana compleja y mixta que actúa como un organismo multicelular y está embebida en una matriz de polisacáridos extracelulares de autoproducción, que las une a las superficies dentales formando estructuras tridimensionales². Una vez que las bacterias se adhieren a un sustrato y forman una comunidad en forma de biopelícula, adquieren una resistencia excepcional no sólo contra los sistemas de defensa del huésped sino también frente a los agentes antimicrobianos y para sobrevivir a condiciones de crecimiento difíciles. Este incremento de la resistencia microbiana, que le confiere la comunidad en forma de biopelícula, contribuye a la persistencia de la patología tras el tratamiento de la enfermedad endodóntica³. Por tanto, el éxito del tratamiento de esta enfermedad depende de la eliminación de estas biopelículas, así como de conseguir la erradicación de las bacterias del *biofilm*⁴.

La eliminación y la destrucción de las bacterias de las biopelículas adheridas a dentina depende en gran medida de la eficacia de soluciones antimicrobianas, en forma de soluciones irrigadoras endodónticas, que reduzcan la microflora infecciosa residual tras la preparación mecánica o que mejoren la remoción de los microorganismos de las superficies no sido instrumentadas durante el tratamiento de conductos^{5,6}.

El hipoclorito de sodio (NaClO) es la solución más utilizada durante y después de la instrumentación endodóntica, por su potente acción antimicrobiana y capacidad de disolver la materia orgánica y el tejido necrótico^{7,8,9}. Sin embargo, debido a que carece de actividad

¹ Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. J Endod 2009;35:1051-5.

² Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15:167-93.

³ Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001;358:135-8.

⁴ Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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 2013;39:473-7.

⁵ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. J Endod 2012;38: 927-30.

⁶ Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Baca P. Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrimide with chelating agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. J Endod 2010;36:1673-5.

⁷ Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 2006;32:527-31.

⁸ Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006;32:389-98.

⁹ Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. J Endod 2009;35:711-4.

antimicrobiana residual, no evita el nuevo crecimiento de microorganismos persistentes^{10,11}. Por el contrario, bis-biguanidas catiónicas y/o agentes tensioactivos tales como la clorhexidina (CLX), o cetrimida (CTR), con eficacia antibiopelícula probada, han demostrado sustantividad y actividad antimicrobiana residual cuando se utilizan como soluciones de irrigación final^{12,13,14,15,16,17,18,19} y la capacidad de inhibir la adherencia de ciertas bacterias a la dentina²⁰. Recientes estudios *in vitro* y *ex vivo* han mostrado de CLX tiene propiedades antimicrobianas sobre biopelículas de *Enterococcus faecalis*^{21,22} pero no alcanza la erradicación. Similar a CLX, alexidina (ALX) es otra bis-biguanida desinfectante con acción bactericida más rápida²³. Concentraciones de 1% y 2% de ALX lograron la erradicación de biopelículas de *Streptococcus mutans* en unidades volumétricas de dentina²⁴. Asimismo, ALX ha demostrado propiedades antimicrobianas, como irrigante endodóntico, contra biopelículas de *E. faecalis* en concentraciones muy bajas²⁵. Cetrimida (CTR) es un agente surfactante catiónico, de actividad antimicrobiana demostrada²⁶, que reduce la tensión superficial de los líquidos, favoreciendo su entrada en lugares de difícil acceso, tales

¹⁰ Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. J Endod 2003;29:562-4.

¹¹ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. J Endod 2011;37:363-6.

¹² Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. J Endod 2011a;37:1121-3.

¹³ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. J Endod 2011;37: 363-6.

¹⁴ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. J Endod 2012;38:927-30.

¹⁵ Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. J Endod 2012;38:826-8.

¹⁶ Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. J Endod 2013;39:1413-5.

¹⁷ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. J Endod 2009;35:981-5.

¹⁸ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. J Endod 2012;38:927-30.

¹⁹ Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. J Endod 2013;39:1413-5.

²⁰ Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. J Endod 2008;34:850-4.

²¹ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. J Endod 2009;35:981-5.

²² Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. J Endod 2011;37: 363-6.

²³ McDonnell, G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev 1999;12:147-79.

²⁴ Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz T, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014 20;13:41.

²⁵ Silveira LF, Baca P, Arias-Moliz MT, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of alexidine alone and associated with N-acetylcysteine against *Enterococcus faecalis* biofilm. Int J Oral Scienc 2013;5:146-9.

²⁶ Vieira DB, Carmona-Ribeiro AM. Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. J Antimicrob Chemother 2006;58:760-7.

como túbulos dentinarios²⁷. Es capaz de erradicar biopelículas de *E.faecalis in vitro*^{28,29} y de *S. mutans ex vivo*³⁰.

El estudio de la eficacia antimicrobiana de los antisépticos *in vitro* se debe realizar utilizando modelos de biopelículas que se acerquen lo más posible a la situación clínica *in vivo*³¹. Dada la etiología polimicrobiana de la infección endodóntica, el estudio de la efectividad antimicrobiana de los desinfectantes, debe efectuarse sobre modelos de biopelículas multiespecies obtenidas a partir de muestras aisladas clínicamente y no sobre biopelículas mono-especies^{32,33}. Aunque las bacterias en la naturaleza rara vez existen en la fase planctónica, la mayoría de los estudios de los agentes antimicrobianos se han basado en cultivos de bacterias planctónicas y se ha demostrado que las bacterias en comunidades de biopelícula pueden ser de 100-1000 veces más resistentes a los agentes antibacterianos que sus homólogas planctónicas³⁴. El estado de maduración del *biofilm* es también una variable importante a considerar ya que una biopelícula madura (tres semanas) es más resistente a los tratamientos antimicrobianos que una biopelícula joven³⁵. Además la elección del sustrato debe tenerse en cuenta³⁶, recomendándose usar la dentina humana debido al hecho de que afecta tanto a la actividad metabólica del *biofilm* como a la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos³⁷.

²⁷ Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. J Endod 2006;32:1091-3.

²⁸ Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. J Endod 2010;36:87-90.

²⁹ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. J Endod 2011;37:363-6.

³⁰ Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz T, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;20:13:41.

³¹ Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. Endod Topics 2010;22: 58-78.

³² Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X *et al.* Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. J Endod 2013;39:1438-43.

³³ Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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 2013;39:473-7.

³⁴ Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 1999;37:1771-6.

³⁵ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. J Endod 2011;37:657-61.

³⁶ Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. J Endod 2013;39:346-50.

³⁷ Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. Eur J Oral Sci 2004;112:42-7.

Hasta la fecha pocos estudios han evaluado la eficacia de NaClO, CLX y CTR sobre biopelículas maduras multiespecies y se han realizado sobre dentina bovina o discos de hidroxiapatita^{38,39,40}; ALX no ha sido aún testada bajo estas condiciones.

Recientes avances en el análisis de la actividad antimicrobiana de soluciones desinfectantes se han logrado con el uso de la tinción de viabilidad fluorescente y su observación con el microscopio de barrido láser confocal (MLC). Este método, a diferencia de los métodos de cultivo tradicionales, hace posible obtener la proporción de bacterias viables y no viables en una imagen tridimensional sin perturbar las células unidas al sustrato^{41,42,43}. La mayoría de las investigaciones anteriores se han centrado en analizar la eficacia de las soluciones antimicrobianas usando medios de cultivo tradicionales, y hasta la fecha, hay pocos resultados de los procedimientos de tinción de fluorescencia y su análisis con MLC para medir el efecto de soluciones usadas como irrigantes endodónticos sobre biopelículas polimicrobianas formadas en dentina⁴⁴.

Por ello los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1.- Evaluar la eficacia antimicrobiana de NaClO al 2.5%, CHX al 2%, ALX al 2% y CTR al 0,2%, frente a biopelículas polimicrobianas de origen endodóntico, formadas en dentina, mediante tinción de fluorescencia y microscopía de barrido láser confocal.
- 2.- Comparar entre sí la efectividad antimicrobiana de las distintas soluciones ensayadas sobre biopelículas polimicrobianas maduras.
- 3.- Determinar si la adición de cetrimida al 0,2% mejora la actividad antimicrobiana de soluciones de CLX y ALX.

³⁸ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod* 2009;35:981-5.

³⁹ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37:657-61

⁴⁰ Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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* 2013;39:473-7.

⁴¹ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37:657-61

⁴² Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomes de Moraes I, Marciano M *et al.* Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012;45:162-8.

⁴³ Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Júnior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrime. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J* 2014;47:1058-63.

⁴⁴ Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J *et al.* Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dental Tubules to Disinfecting Solutions. *J Endod* 2016;42:1246-50.

Introducción

2.1 MICROBIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN ENDODÓNTICA

2.1.1. BIOPELÍCULAS MICROBIANAS COMO FACTOR ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD PULPAR Y PERIAPICAL.

La infección pulpar y periapical es comúnmente secuela de la caries dental⁴⁵, que es la enfermedad oral, biopelícula - dependiente más común en todo el mundo. La caries resulta de la interacción específica, en un hospedador susceptible, de constituyentes bacterianos y salivares con los carbohidratos de la dieta en un *biofilm*, llamado placa bacteriana, estrechamente adherido a la superficie dental^{46,47}. Muchos años de investigación han demostrado que ésta es una biopelícula altamente especializada, coordinada, formada por múltiples especies de microorganismos, que se encuentran de forma permanente en la superficie del diente, rodeada por una matriz de polisacáridos extracelulares (EPS). Los microorganismos del biopelícula dental son los responsables de la caries y de las infecciones pulpares y periapicales.

Las infecciones endodónticas están causadas por una comunidad microbiana mixta organizada en forma de biopelícula que actúa como un organismo multicelular embebido en una sustancia polimérica extracelular⁴⁸. El preámbulo para arrojar luz sobre la etiología y la patogénesis de las infecciones endodónticas es entender la microbiota oral como una comunidad de comensales que pueden cambiar a patógenos oportunistas⁴⁹. La cavidad oral está colonizada por una gran diversidad de microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos, protozoos y arqueobacterias, designados colectivamente como el "microbioma oral"⁵⁰. Basado en el análisis filogenético de las secuencias de genes 16S rRNA, el microbioma oral comprende más de 1000 taxones individuales, la mayoría de los cuales aún no han sido cultivados. Cabe destacar que es el segundo microbioma más complejo en el cuerpo humano, después del colon⁵¹.

Las bacterias de la cavidad oral se dividen en 13 *phyla* individuales, siendo los más frecuentes, *Fusobacteria*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Proteobacterias*, *Espiroquetas*, *Synergistetes* y *TM7*⁵².

⁴⁵ Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. J Endod 1981;7:100-4.

⁴⁶ Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? Crit Rev Oral Biol Med 2002;13:126-31.

⁴⁷ Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology 2003;149:279-94.

⁴⁸ Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. Int Endod J 2006;39:249-81.

⁴⁹ Zehnder M, Belibasakis GN. On the dynamics of root canal infections— what we understand and what we don't. Virulence 2015; 6:216-222.

⁵⁰ Wade WG. The oral microbiome in health and disease. Pharmacol Res 2013;69:137-43.

⁵¹ Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT *et al*. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 2012;486:207-14.

⁵² Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH *et al*. The human oral microbiome. J Bacteriol 2010;192:5002-17.

Los géneros más representativos de *phyla* SR1, *Cyanobacteria*, *Deinococcus* y *Ácidobacteria* son menos frecuentes^{53,54}.

Los microorganismos en la cavidad oral forman dos tipos de biofilm en la superficie de los dientes: La placa supragingival y la placa subgingival, que difieren significativamente en la composición de la flora bacteriana. La placa supragingival contiene flora predominantemente Gram positiva, comúnmente asociada a microorganismos cariogénicos (microorganismos acidogénicos y acidofílicos) incluyendo *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* y *Lactobacillus*. La placa subgingival, está compuesta en mayor cantidad de microorganismos anaerobios Gram negativos, tales como *Actinobacillus*, *Campylobacter*spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*⁵⁵, que son preferentemente periodontopatogénicos. La causa de la caries dental es generalmente el microbioma supragingival. El microbioma subgingival está asociado con la gingivitis y la enfermedad periodontal⁵⁶.

La invasión de los túbulos dentinarios por las bacterias que componen la placa supragingival o subgingival ocurre cuando la dentina está expuesta en la cavidad bucal. Esto puede ser a través de lesiones cariosas, restauraciones filtradas, procesos periodontales, o traumatismos dentarios. La invasión tubular puede causar la enfermedad pulpar y posteriormente provocar la infección del sistema de conductos radiculares. *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp. son las bacterias más frecuentes presentes en la placa dental y son las primeras en iniciar la infección pulpar⁵⁷, sin embargo debido a la dinámica de la flora del conducto radicular ocurre una selección bacteriana pasando a ser dominada por bacterias anaerobias Gram negativas como *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*^{58,59} e incluso contener levaduras⁶⁰.

⁵³ Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-83.

⁵⁴ Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ *et al.* Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:61-8.

⁵⁵ Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 2009;88:982-90.

⁵⁶ Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burlinson JA, Strausbaugh LD *et al.* The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* 2013;7:1016-25.

⁵⁷ Jenkinson HF, Lamont RJ. *Streptococcal* adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:175-200.

⁵⁸ Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. *Int Endod J* 1990;23:20-7.

⁵⁹ Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001;27:76-81.

⁶⁰ Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:6-9.

ESTRUCTURA Y FORMACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS DENTALES

La aplicación de técnicas modernas de investigación, han contribuido al conocimiento de una estructura, altamente compleja, como es la placa dental, una de las primeras estructuras formadas por bacterias que ha sido descritas como biopelícula o *biofilm*^{61,62}. La biopelícula dental es un ejemplo arquetípico de un *biofilm* complejo⁶³. Un buen conocimiento del proceso de formación y estructura funcional de esta biopelícula es muy importante para el desarrollo de nuevas estrategias dirigidas al tratamiento de la enfermedad⁶⁴.

Una biopelícula puede definirse como una comunidad microbiana sésil, caracterizada por bacterias que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica^{65,66}. Las biopelículas pueden estar constituidas no sólo por células bacterianas, sino también por hongos, virus, proteínas, DNA extracelular y otros factores^{67,68}.

La formación y desarrollo de la placa o biopelícula dental sigue las mismas reglas básicas que la formación del biofilm en otras partes de la naturaleza. Stoodley *et al.*⁶⁹ presentaron un modelo dinámico general del desarrollo de las biopelículas basado en cinco estadios o etapas (**Figura 2.1.**).

⁶¹ Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PØ *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011; 3:55-65.

⁶² Ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontol* 2006;94:1-9.

⁶³ Costerton JW, Cook G, Lamont R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. En: Newman HN, Wilson M (eds). *Dental plaque Revisited. Oral biofilms in health and disease*. Cardiff, UK: BioLine 1995:5-14.

⁶⁴ Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol* 2014;63:127-35.

⁶⁵ Huang M, Meng L, Fan M, Hu P, Bian Z. Effect of biofilm formation on virulence factor secretion via the general secretory pathway in *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2008;53:1179-85.

⁶⁶ Lo AW, Seers CA, Boyce JD, Dashper SG, Slakeski N, Lissel JP *et al.* Comparative transcriptomic analysis of Porphyromonas gingivalis biofilm and planktonic cells. *BMC Microbiol* 2009;29:9:18.

⁶⁷ Fuxman Bass JI, Russo DM, Gabelloni ML, Geffner JR, Giordano M, Catalano M *et al.* Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Immunol* 2010;184:6386-95.

⁶⁸ Watters C, Everett JA, Haley C, Clinton A, Rumbaugh KP. Insulin treatment modulates the host immune system to enhance *Pseudomonas aeruginosa* wound biofilms. *Infect Immun* 2014;82:92-100.

⁶⁹ Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56:187-209.

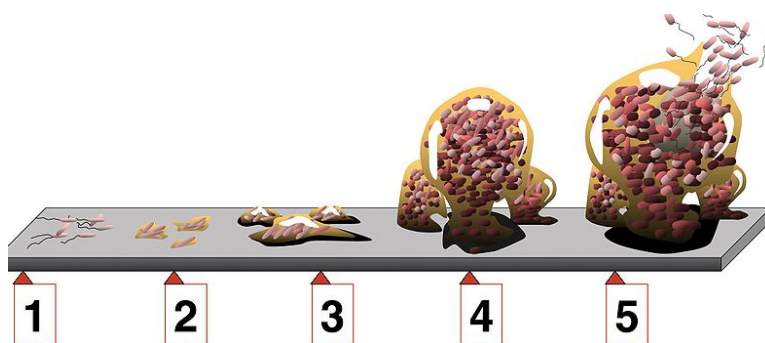


Figura 2.1. Estadios de formación y maduración de la biopelícula. Imagen tomada de Monroe D⁷⁰.
Estadio 1, adhesión inicial; 2, adhesión irreversible; 3, maduración I; 4, maduración II; 5, dispersión.

El primer estadio es la adhesión inicial de las bacterias que flotan libremente en el medioambiente oral a la superficie dentaria. La presencia de la película adquirida, constituida por polímeros y proteínas de la saliva, fluido gingival y comida, es necesaria y fundamental para la adhesión bacteriana. Se forma sobre la superficie dentaria inmediatamente después de su cepillado. Esta película altera la energía superficial y las cargas de la superficie y provee a la misma de receptores específicos para la adhesión bacteriana. Tras su formación sobre el esmalte, comienza la rápida colonización por los microorganismos orales. Entre los primeros colonizadores se encuentran sobretodo diferentes especies de *Streptococcus spp.* y *Actinomyces spp.*⁷¹, aunque *Eikenella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Prevotella spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Priopionibacterium spp.* y *Veillonella spp.*, han sido identificadas en el 60-90% de los casos^{72,73,74}. Durante la adhesión microbiana primaria, las bacterias planctónicas se acercan a la superficie gracias a una corriente de flujo, por quimiotaxis o movilidad de la propia bacteria y fuerzas electrostáticas entre bacterias y superficie determinan la atracción o repulsión entre ellas. Es una fase de adhesión reversible.

La segunda etapa, o de expresión génica diferencial, ocurre inmediatamente después de la adhesión de las bacterias a la superficie o a otras bacterias y consiste en la transformación de los primeros colonizadores de un estado planctónico a un modo de crecimiento de biopelícula.

⁷⁰ Monroe, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* 2007;5:e307.

⁷¹ Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:69-75.

⁷² Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:471-80

⁷³ Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* 2009;19:636-43.

⁷⁴ Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J* 2012;212:601-6.

En este estadio, los genes para un crecimiento planctónico óptimo, (como genes para la movilidad, el reconocimiento y la adhesión a sustratos) se suprimen y se expresan activamente genes más adecuados para el crecimiento y formación de una biopelícula, como genes para la producción de polisacáridos extracelulares, con polipéptidos, carbohidratos y ácidos nucleicos^{75,76,77}.

La producción de exopolisacáridos por parte de las bacterias favorece la unión de éstas a la superficie, y de esta forma, las bacterias se adhieren firmemente en la biopelícula. Esta expresión génica diferencial asegura la heterogenicidad para la función especializada dentro de la biopelícula.

En la tercera fase, tiene lugar el crecimiento y conformación tridimensional y funcional de la arquitectura del *biofilm*. La división controlada de las células y la muerte celular programada, va conformando la estructura del *biofilm* creciendo hacia arriba, en pilas de células, a través de la cual circulan canales de fluido. La biopelícula va madurando por una combinación de procesos: división y crecimiento celular, dispersión fuera de la biopelícula a nuevas superficies, unión de nuevas células del medio ambiente, ya sea directamente a la biopelícula existente (coadhesión) o primero a través de coagregación entre las células bacterianas seguida de una posterior unión al *biofilm* formando estructuras típicas (ej. Estructuras en mazorca de maíz o roseta)⁷⁸. En esta fase el *biofilm* puede atraer y unirse a otros colonizadores posteriores entre los que se incluyen *Fusobacterium nucleatum* (que sirve de nexo de unión entre los colonizadores primarios y posteriores)⁷⁹, *Actinobacillus spp.*, *Prevotella spp.*, *Eubacterium spp.*, *Treponema spp.* y *Porphyromonas spp.*^{80,81}.

En el cuarto estadio termina la maduración del *biofilm*. Cuando la biopelícula está desarrollada completamente empieza a exhibir características estructurales típicas.

⁷⁵ Lo AW, Seers CA, Boyce JD, Dashper SG, Slakeski N, Lissel JP *et al.* Comparative transcriptomic analysis of *Porphyromonas gingivalis* biofilm and planktonic cells. BMC Microbiol 2009;29:9:18.

⁷⁶ Huang M, Meng L, Fan M, Hu P, Bian Z. Effect of biofilm formation on virulence factor secretion via the general secretory pathway in *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 2008;53:1179-85.

⁷⁷ Mitchell HL, Dashper SG, Catmull DV, Paolini RA, Cleal SM, Slakeski N *et al.* *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin-antitoxin systems and transposases. Microbiol 2010;156:774-88.

⁷⁸ Listgarten MA, Mayo H, Amsterdam M. Ultrastructure of the attachment device between coccid and filamentous microorganisms in "corn cob" formations of dental plaque. Arch Oral Biol 1973;18:651-6.

⁷⁹ Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol 1993;175:3247-52.

⁸⁰ Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. Nat Rev Microbiol 2010;8:471-80.

⁸¹ Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. Genome Res 2009;19:636-43.

Aunque las formas de biopelícula que se han descrito son muy variadas, desde pequeñas formaciones hasta cadenas de biopelículas, la formación más característica es en forma de seta (mushroom-shape)⁸². En ella los microorganismos están dispuestos en estructuras ordenadas y complejas que consisten en microcolonias bacterianas. La biopelícula madura se compone de un número incontable de microcolonias, recubiertas con una capa de exopolisacáridos y separadas unas de otras por numerosos canales de fluido, lo que crea un sistema de comunicación única entre las células del *biofilm*. Estos canales de fluido aportan nutrientes, oxígeno, enzimas, metabolitos, moléculas de señalización y eliminan productos de desecho desde las capas inferiores del *biofilm*⁸³. Además, actúa como una protección para sus habitantes contra factores externos, incluyendo antibióticos, anticuerpos, bacteriófagos y leucocitos⁸⁴. Por lo tanto, desempeña un triple papel: rodea, abrocha y protege.

La quinta y última etapa consiste en la dispersión de las células de la biopelícula madura, de forma activa o pasiva por desprendimiento, para colonizar otras superficies con el fin de formar nuevas comunidades bacterianas, comenzando de nuevo el ciclo vital de la biopelícula.

MECANISMOS DE VIRULENCIA

Se ha postulado que la asociación de bacterias en forma de biopelícula no es más que un mecanismo de adaptación de estos microorganismos a un entorno nuevo, generalmente hostil^{85,86}.

Una vez formada la biopelícula, esta estructura bacteriana se encuentra embebida en una *matriz tridimensional extracelular de polisacáridos* autoproducida^{87,88} que proporciona un andamio esencial para el desarrollo y supervivencia de la biopelícula y es plena expresión de su virulencia^{89,90}. La densidad, la composición y la estructura de la matriz extracelular, depende de la composición bacteriana y se ve influenciada por los cambios en el medio que les rodea.

⁸² Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28:689-93.

⁸³ Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:187-209.

⁸⁴ Clinton A, Carter T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. *Lab Med* 2015;46:277-84.

⁸⁵ O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79.

⁸⁶ George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31:867-72.

⁸⁷ Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Scienc* 1999;284:1318-22.

⁸⁸ Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC. Evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002;28:815-8.

⁸⁹ Flemming H-C, Wingender: The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:623-33.

⁹⁰ Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R: Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005;13:20-6.

Está compuesta de una variedad de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), como exopolisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e incluso lipooligosacáridos^{91,92}. Los EPS son el componente clave de la matriz en la biopelícula. Sencillamente, no hay ninguna biopelícula sin una matriz de polisacárido extracelular. Desempeña un papel crítico en la virulencia de la biopelícula puesto que influye en las propiedades físicas y bioquímicas de la misma, mejorando la adhesión y promoviendo la cohesión de microorganismos, actuando como reservorio de energía, y constituyendo una barrera mecánica que disminuye la efectividad a antimicrobianos y a células del sistema inmune^{93,94}. Una de las funciones importantes de EPS, es la protección de estos microorganismos en contra del sistema de defensa del huésped y esto es especialmente significativo para la naturaleza patógena de los microorganismos cariogénicos. El recubrimiento hecho de polisacáridos, debido a su naturaleza hidrófila, protege eficazmente las bacterias de la fagocitosis⁹⁵. Además, protege a la biopelícula de los agentes externos, como la radiación ultravioleta, agentes antibióticos y desinfectantes, confiriéndole mayor resistencia que a sus homólogos en estado planctónico^{96,97,98}. Supone una barrera física y química, evitando el paso de agentes externos indeseables y manteniendo un ambiente adecuado para la supervivencia^{99,100,101}.

Las interacciones biológicas tienen un papel crucial en la estructura de las comunidades microbianas^{102,103}.

⁹¹ Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009;73:310-47.

⁹² Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000354.

⁹³ Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol* 2010;192:3024-32.

⁹⁴ James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini Ed, Secor P, Sestrich J. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008;16:37-44.

⁹⁵ Allison D.G. The biofilm matrix. *Biofouling* 2003;19:139-50.

⁹⁶ Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* 2000; 88:22-30.

⁹⁷ Elasm MO, Miller RV. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:2025-31.

⁹⁸ Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-8.

⁹⁹ Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod* 2006; 32:312-8.

¹⁰⁰ Chávez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007;33:652-62.

¹⁰¹ Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001;9:34-9.

¹⁰² Biswas S, Biswas I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 2005;73: 6923-34.

¹⁰³ Kolebrand PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:471-80.

Una propiedad muy importante de las bacterias en forma de biopelícula, mucho mejor desarrollada que en el caso de sus homólogas células planctónicas, es la capacidad de comunicarse entre sí y regular los procesos metabólicos, mediante el *Quorum Sensing* (QS)¹⁰⁴, que representa una vía de señalización que se activa como respuesta a la densidad celular¹⁰⁵.

Así, cuando una especie de bacterias alcanza una masa crítica de población, se producen moléculas de señalización (autoinductores) en una concentración suficientemente alta para alterar la expresión génica¹⁰⁶ lo que permite que las bacterias puedan coordinar su actividad en función del tamaño de la población. Este sistema además necesita un receptor correspondiente que regula la expresión del gen cuando la concentración de la señal ha alcanzado el umbral de concentración. Las moléculas autoinducidas pueden difundirse pasivamente entre las células que activan los receptores intracelulares, alterando la expresión de genes directamente, o son activamente transportadas fuera de las células al unirse a receptores transmembranales dando por resultado la transducción de señales y cambios posteriores en la expresión génica¹⁰⁷. Muchas proteínas y factores de virulencia producidos por bacterias se expresan diferencialmente en respuesta a QS, incluyendo los genes responsables de la formación de biopelículas.

Por tanto, las bacterias del *biofilm* tienen programas de expresión génica complejos que están regulados cuando cohabitan en poblaciones densas. Por ejemplo, ante estados carenciales de nutrientes, pueden cambiar su actividad y ralentizar su metabolismo, lo que es esencial para prevenir una acumulación de residuos metabólicos o el agotamiento de los nutrientes¹⁰⁸. Las bacterias son capaces de identificar con precisión la naturaleza química de las señales y su umbral de concentración en el medio ambiente, lo que permite su crecimiento y el control específicos de los procesos fisiológicos y metabólicos de la totalidad de la población¹⁰⁹.

¹⁰⁴ Struzycka I. The Oral Microbiome in Dental Caries. *Polish J Microbiol* 2014;63:127–35.

¹⁰⁵ Kuboniwqa M, Tribble GB, Hendrikson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2012;9:311–23.

¹⁰⁶ Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 2003;185:2066–79.

¹⁰⁷ Clinton A, Carter T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. *Lab Med* 2015;46:277–84.

¹⁰⁸ Scheie AA, Petersen FC. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15:4–12.

¹⁰⁹ Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Top Microbiol Immunol* 2008;322:67–84.

Además, la proximidad mutua de las células fomenta el intercambio de la información genética por transferencia de plásmidos, incluyendo los que codifican para la resistencia a las sustancias antimicrobianas^{110,111}.

Las bacterias en condiciones de estrés como una baja tasa de nutrientes, cambios de temperatura, presencia de pH extremos o salinidad en el medio, pueden desarrollar reacciones adaptativas eficientes como mecanismos de supervivencia frente a estas condiciones¹¹². La privación de nutrientes estimula un estado de inanición (*starvation*), que permite a las bacterias su persistencia a largo plazo en un estado viable pero no cultivable (*viable but non culturable state*)¹¹³. En este estado las bacterias no son cultivables en los medios bacteriológicos tradicionales. Sin embargo, están vivas y aunque en este estado normalmente muestran niveles muy bajos de actividad metabólica, son capaces de reactivarse o “resucitar” si las condiciones en el medio se vuelven favorables^{114,115}, recuperando su tasa de crecimiento normal¹¹⁶. Por tanto mantienen su patogenicidad en este estado¹¹⁷. Bacterias Gram-negativas y Gram-positivas pueden entrar en este estado frente a estas condiciones hostiles^{118,119,120}, conservando tasas de metabolismo activo¹²¹ integridad de la membrana¹²², transcripción de genes y producción de RNA mensajero.

¹¹⁰ Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:114–22.

¹¹¹ Roberts AP, Mullany P. Oral Biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect* 2010; 20:1441–50.

¹¹² Watson SP, Clements MO, Foster SJ. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1998;180:1750–8.

¹¹³ Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 2005;43:93–100.

¹¹⁴ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture. *J Endod* 2010;36:1820–3.

¹¹⁵ Lleó MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Pruzzo C, Canepari P. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. *Letters in Applied Microbiology* 2005;40:289–94.

¹¹⁶ Signoretto C, Lleó MM, Tafi MC, Canepari P. Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Nonculturable State. *Appl Environ Microbiol* 2000;6:1953–9.

¹¹⁷ Oliver JD, Bockian R. *In vivo* resuscitation and virulence towards mice of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2620–3.

¹¹⁸ Rollins DM, Colwell RR. Viable but non-culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* 1996; 52:531–8.

¹¹⁹ Morgan JA, Rhodes W, Rickup RW. Survival of nonculturable *Aeromonas salmonicida* in lake water. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59:874–80.

¹²⁰ Barer MR, Gibbon LT, Harwood CR, Nwoguh CE. The viable but nonculturable hypothesis and medical microbiology. *Rev Med Microbiol* 1993;4:183–91.

¹²¹ Rahman I, Shahamat M, Kirchman PA, Rissek-Cohen E, Colwell RR. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but non-culturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3573–8.

¹²² Lloyd D, Hayes AJ. Vitality and viability of microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 1995;133:1–7.

Según la literatura, el número de especies capaces de alcanzar un estado viable pero no cultivable aumenta constantemente, incluyendo *E. faecalis* en respuesta a condiciones desfavorables^{123,124,125}, el microorganismo más frecuentemente aislado en las infecciones endodónticas recurrentes^{126,127,128}.

2.1.2. INFECCIÓN DEL CONDUCTO RADICULAR.

Ya en 1965, Kakeshasi *et al.*¹²⁹ establecieron que la agresión microbiana es la responsable del proceso infeccioso que acontece en el tejido pulpar y posteriormente en los tejidos periapicales. La mayor parte de las bacterias presentes en el sistema de conductos radiculares provienen de la microbiota oral¹³⁰. Las bacterias procedentes de la placa supragingival y subgingival acceden a la pulpa dental o a los tejidos periapicales, causando la infección. Generalmente esta vía de acceso suele ser por pérdida de integridad de los tejidos que protegen a la pulpa dental, bien como consecuencia de la lesión de caries, o por traumatismos y/ fracturas dentarias, porque favorece la invasión microbiana, provocando la infección del conducto radicular. Los microorganismos también pueden llegar a la pulpa a través de la vía periodontal, filtraciones marginales de las restauraciones, contigüidad y anacoresis^{131,132,133}.

Cuando la invasión pulpar acontece a través de la infección de los túbulos dentinarios desde un foco de caries, la infección radicular instaurada se conoce como *infección endodóntica primaria*¹³⁴.

¹²³ Lleó, MM, Pierobon S, Tafi MC, Signoreto C, Canepari P. mRNA detection by RT-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. Appl Environ Microbiol 2000;66:4564-7.

¹²⁴ Lleó MM, Tafi MC, Signoreto C, Dal Cero C, Canepari P. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. FEMS Microbiol Ecol 1999;30:345-53.

¹²⁵ Lleó MM, Bonato B, Tafi MC, Signoreto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different *enterococcal* species in the viable but nonculturable state. J Appl Microbiol 2001;91:1095-102.

¹²⁶ Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals *ex vivo*. Int Endod J 2005;38:735-42.

¹²⁷ Sedgley CM. The influence of root canal sealer on extended intracanal survival of *Enterococcus faecalis* with and without gelatinase production ability in obturated root canals. J Endod 2007;33:561-6.

¹²⁸ Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JMI. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. Endod Topics 2005;10:77-102.

¹²⁹ Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965;20:340-9.

¹³⁰ Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. Oral Microbiol Immunol 1997;12:318-22.

¹³¹ Love RM. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. Endod Dent Traumatol 1996;12:289-93.

¹³² Peters LB, Wesseling PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. Int Endod J 1995;28:95-9.

¹³³ Pashley DH. Clinical considerations in microleakage. J Endod 1990;16:70-7.

¹³⁴ Haapasalo M, Quian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontics medicaments. J Endod 2007;33:917-25.

La microflora presente consiste principalmente en las bacterias cariogénicas que invadieron la dentina desde un foco de caries.

Estos primeros colonizadores dentinarios corresponden a especies bacterianas cariogénicas sacarolíticas de crecimiento rápido como *Streptococcus spp.* especialmente *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Actinomyces spp.*, *Lactobacilli spp.* y otras Gram-positivas¹³⁵. Estas bacterias fundamentalmente metabolizan glúcidos de origen sérico como fuente de nutrientes¹³⁶. Conforme avanza la lesión cariosa en la dentina profunda se produce una selección microbiana hacia especies Gram-positivas anaerobias como *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium spp*¹³⁷, junto con especies de *Actinomyces* y *lactobacilos*, siendo *Streptococcus spp.* menos relevantes¹³⁸. Una vez establecida la infección pulpar, el líquido hístico y los productos de degradación de la pulpa necrótica brindan nutrientes ricos en polipéptidos y aminoácidos. Debido a la baja tensión de oxígeno, la presencia de subproductos derivados del metabolismo y los mecanismos de adaptación al medio, determinarán las especies predominantes^{139,140}. Varios autores también han identificado en la infección del conducto radicular especies de espiroquetas como *Treponema spp* y levaduras como *Candida spp.* y *Saccharomycyes*¹⁴¹. Por tanto el conducto radicular consiste en un hábitat selectivo para el crecimiento de determinadas especies bacterianas y donde además es frecuente la presencia de bacterias en forma de biopelícula como mecanismo de adaptación a las condiciones donde permanecen^{142,143}.

La presencia de biopelículas en el conducto radicular se ha descrito tanto en el interior del mismo como en la superficie externa de la raíz^{144,145} siendo más frecuentes las de localización

¹³⁵ Loesche WJ, Syed SA. The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentin. *Caries Res* 1973;7:201-16.

¹³⁶ Pumarola Suñé J. Microbiología endodóntica. En: Canalda Sahli C, Brau Aguadé E (Eds). *Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas*. 3º Ed. Barcelona, España Masson; 2014;4:28.

¹³⁷ Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *lactobacillus* species presents in advanced dental caries. *Clin Microbiol* 2004;42:3128-36.

¹³⁸ Edwardsson S. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. *Odontol Revy* 1974;25:1-143.

¹³⁹ Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:257-62.

¹⁴⁰ Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;18:427-30.

¹⁴¹ Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan JS *et al.* Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:100-5.

¹⁴² Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod* 2006;32:312-8.

¹⁴³ Chávez de Paz LE, Bergeholtz G, Dahlen G, Svensater G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J* 2007; 40:344-55.

¹⁴⁴ Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2002;28:12-55.

¹⁴⁵ Ricucci D, Martorano M, Bate AL, Pascon EA. Calculus-like deposit on the apical external root surface of teeth with post-treatment apical periodontitis: report of two cases. *Int Endod J* 2005;38:262-71.

intrarradicular, a lo largo de todo su recorrido y adheridas a las paredes, istmos y ramificaciones del conducto¹⁴⁶, junto con bacterias en suspensión que se reparten por todo el sistema de conductos. Se considera que el tercio apical es la zona más predispuesta a su anidamiento, puesto que en ella se dan los factores adecuados para que las bacterias formen biopelículas, debido a la anatomía más compleja, a una menor acción de los irrigantes y medicamentos, baja tensión de oxígeno y cierto acceso a nutrientes, provenientes de los tejidos pulpaes y/o periapicales¹⁴⁷.

Por tanto la infección endodóntica primaria es de carácter polimicrobiano¹⁴⁸ y las especies bacterianas detectadas son representativas de la cavidad oral como bacteroides, fusobacterias, actinobacterias, espiroquetas o proteobacterias^{149,150,151} aunque son infecciones de una gran variabilidad entre individuos mostrando una microbiota endodóntica única en cada conducto^{152,153}.

En estadios más avanzados de la inflamación pulpar, los glúcidos séricos se agotan y la metabolización de aminoácidos se vuelve indispensable para el crecimiento bacteriano, esta fuente de energía es utilizada por bacterias anaerobias de los géneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* y *Peptostreptococcus*¹⁵⁴. La transformación anaerobia de la microflora radicular se establece por la destrucción del tejido conectivo por bacterias aerobias y anaerobias facultativas y da origen a nutrientes utilizados por las bacterias estrictamente anaerobias y así sucesivamente, otras bacterias son capaces de aprovechar los metabolitos producidos por otros microorganismos, conformándose una microflora selectiva¹⁵⁵. Cuando se establece la necrosis pulpar, entre las bacterias que predominan se incluyen aerobios estrictos, anaerobios facultativos o microaerofílicos como microorganismos concomitantes.

¹⁴⁶ Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod 2010;36:1277-88.

¹⁴⁷ Chávez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. J Endod 2007;33:652-62.

¹⁴⁸ Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo A. *Actinomyces* species, *streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. J Endod 2002;28:168-72.

¹⁴⁹ Siqueira JF, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly primary and persistent endodontic infections. J Clin Microbiol 2005; 43:3314-9.

¹⁵⁰ Muson MA, Pitt-Ford T, Chony B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res 2002;81:761-6.

¹⁵¹ Rôças IN, Siqueira JF. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol 2008;46:3599-606.

¹⁵² Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;97:85-94.

¹⁵³ Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Peixoto RS *et al*. Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Oral Microbiol Immunol 2007;22:14-8.

¹⁵⁴ Pumarola Suñé J. Microbiología endodóntica. En: Canalda Sahli C, Brau Aguadé E (Eds). Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas. 3ª Ed. Barcelona, España Masson; 2014;4:26.

¹⁵⁵ Loesche WJ. Importance of nutrition in gingival crevice microbial ecology. Periodontics 1968;6:245-9.

Estos últimos y los aerobios estrictos disminuyen la tensión de oxígeno y un potencial de oxidoreducción, favoreciendo unas condiciones ideales para el desarrollo de bacterias estrictamente anaerobias. Las bacterias más frecuentemente aisladas en la necrosis pulpar son *Porphyromonas* y *Prevotella*^{156,157,158}. Por tanto, un sistema de conductos radiculares infectado actúa como reservorio de antígenos, que colectivamente pueden mantener la infección endodóntica debido a su pontencial virulento.

Por ello el éxito de su tratamiento depende de la eliminación de la carga bacteriana del conducto infectado para alcanzar la curación¹⁵⁹. Durante el tratamiento, la preparación quimiomecánica desempeña un papel crítico en la desinfección causando una reducción drástica de las poblaciones bacterianas en el conducto radicular principal. Además de los procedimientos mecánicos, para mejorar significativamente la eliminación bacteriana, está indicado el uso de sustancias antimicrobianas como agentes irrigantes^{160,161,162}. La mayoría de las bacterias presentes en el conducto radicular son sensibles al tratamiento convencional. Sin embargo, algunas de ellas pueden sobrevivir y pueden estar presentes en el momento de la obturación del conducto.

La persistencia de microorganismos en el conducto radiucular y/o la filtración corono-apical tras realizar el tratamiento endodóntico, se conoce como infección endodóntica secundaria y da lugar al fracaso del tratamiento. Por tanto, la presencia de periodontitis apical persistente o emergente después del tratamiento de conductos resulta de un tratamiento de conductos donde la infección endodóntica no ha sido debidamente controlada o erradicada^{163,164}.

¹⁵⁶ Gomes BPF, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.

¹⁵⁷ Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan JS *et al.* Microorganisms isolated from root Canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:100-5.

¹⁵⁸ Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN, Coelho AMA. Red Complex (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91:468-71.

¹⁵⁹ Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291-301.

¹⁶⁰ Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002;28:181-4.

¹⁶¹ El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:560-9.

¹⁶² Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-98.

¹⁶³ Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJR. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 2006;114:278-85.

¹⁶⁴ Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 2005;31:863-6.

En la infección endodóntica primaria, el conducto radicular está abierto debido a la destrucción de los tejidos que lo protegían y este contacto con el medio oral favorece la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos. Sin embargo, en la infección endodóntica persistente o secundaria, existe una evidente disminución en la disponibilidad de recursos para los microorganismos en el conducto radicular, debido a la preparación químico-mecánica del conducto radicular, la posible colocación de una medicación intraconducto, y la obturación del mismo donde se sellan los conductos radiculares. Por tanto, la adquisición de nutrientes, salvo filtración se vuelve inexistente. En esta situación las bacterias Gram-negativas disminuyen progresivamente, y dan paso a la presencia de bacterias Gram-positivas, incluyendo *Streptococcus* spp, *Parvimonas micra*, *Actinomyces* spp, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* spp y *Enterococcus* spp^{165,166}. Por tanto la enfermedad periapical crónica es causada por varias especies, y sus interacciones son muy complejas^{167,168}. Sin embargo, gracias al empleo de técnicas moleculares, también se ha indicado la presencia de *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Treponema* spp. en infecciones endodónticas secundarias^{169,170}.

Una de las especies de *enterococos* más frecuentemente aislada en estas infecciones persistentes es *E. faecalis*^{171,172,173} teniendo la capacidad de adaptarse a duros cambios ambientales, tales como pH alcalino, privación de la nutrición y resistencia a antimicrobianos^{174,175}.

¹⁶⁵ Chávez de Paz LE, Molander A, Dahlen G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *Int Endod J* 2004;37:579–87.

¹⁶⁶ Chu FC, Leung WK, Tsang PC, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *J Endod* 2006; 32:17–23.

¹⁶⁷ Vengerfeldt V, Spilka K, Saag M, Pream JK, Oopkaup K, Truu J *et al*. Highly diverse microbiota in dental root canals in cases of apical periodontitis (data of illumina sequencing). *J Endod* 2014;40:1778–83.

¹⁶⁸ Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K *et al*. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod* 2014;40:670–7.

¹⁶⁹ Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC *et al*. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod* 2006; 32:937–40.

¹⁷⁰ Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* 2009;35:950–7.

¹⁷¹ Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod* 2006;32:722–6.

¹⁷² Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:1950–5.

¹⁷³ Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. *J Endod* 2015;41:1207–13.

¹⁷⁴ Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32:93–8.

¹⁷⁵ Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J* 2007;52:64–82.

2.2. SOLUCIONES ANTIMICROBIANAS EN ENDODONCIA

Existen factores locales y sistémicos que contribuyen al fracaso del tratamiento endodóntico¹⁷⁶. Sin embargo, el factor decisivo que influye en el resultado de dicho tratamiento a largo plazo es la persistencia de microorganismos dentro del complejo sistema de conductos radiculares^{177,178,179}. Los microorganismos remanentes pueden encontrarse en las complejidades anatómicas del sistema de conductos como ramificaciones apicales, istmos, túbulos dentinarios y otras irregularidades, que son inaccesibles a la instrumentación mecánica. Se ha demostrado que alrededor del 35% del área del conducto radicular instrumentado queda intacto cuando se instrumenta mecánicamente¹⁸⁰. Por lo tanto, la eliminación y la erradicación de las bacterias del *biofilm* en los conductos radiculares, dependen en gran medida de la eficacia de los irrigantes endodónticos¹⁸¹.

Los objetivos de la irrigación en el tratamiento endodóntico son disolver los restos pulpares vitales o necróticos, la limpieza de las paredes del conducto, eliminación bacteriana y neutralización de sus productos, así como acción lubricante para el paso de los instrumentos y blanqueante para la corona dentaria¹⁸². Idealmente, las soluciones irrigadoras endodónticas deberían cumplir todos estos requisitos, además de no tener toxicidad y baja tensión superficial¹⁸³ y muy importante, tener actividad antimicrobiana residual¹⁸⁴, manteniendo su eficacia antimicrobiana a largo plazo. Esto último, permitiría eliminar bacterias persistentes tras el tratamiento endodóntico y prevenir la recolonización bacteriana en dientes con periodontitis apical persistente¹⁸⁵.

¹⁷⁶ Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34:1-10.

¹⁷⁷ Siqueira JF Jr, Lopes HP. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 2001;34:216-20.

¹⁷⁸ Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002;28:679-83.

¹⁷⁹ Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990; 16:498-504.

¹⁸⁰ Peters OA, Schonenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J* 2001;34:221-30.

¹⁸¹ Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002;28:181-4.

¹⁸² Canalda Sahli C. Preparación de los conductos radiculares. En: Canalda Sahli C, Brau Aguadé E (Eds). *Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas*. 3º Ed. Barcelona, España Masson; 2014;15:186.

¹⁸³ Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-98.

¹⁸⁴ Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002;28:181-4.

¹⁸⁵ Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291-301.

El hipoclorito sódico (NaClO) y clorhexidina (CLX) son las soluciones irrigadoras con acción antimicrobiana más usadas en endodoncia; recientemente se han incorporado otros compuestos que, aunque son antimicrobianos, son más conocidos por su acción surfactante. Entre ellos encontramos los derivados del amonio cuaternario como bromuro de cetiltrimetilamonio o cetrimida (CTR). Ninguno de ellos elimina el componente inorgánico del barrillo dentinario que se crea con la instrumentación mecánica. Por ello, se utilizan soluciones ácidas o quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido maleico, entre otros.

2.2.1. HIPOCLORITO DE SODIO

El hipoclorito de sodio (NaClO) es la solución irrigadora más usada en endodoncia desde que en 1980, Cunningham WT. *et al*¹⁸⁶ lo propusieran como la solución irrigadora más eficaz. Es un compuesto halogenado, altamente oxidante y un agente de amplio espectro antibacteriano, esporicida y viricida. Actúa sobre la viabilidad bacteriana frente a microorganismos en estado planctónico y en forma de biopelícula, promoviendo la disrupción de la matriz extracelular de éstas, así como su disolución^{187,188,189,190}. Esta función biológica se produce mediante la reacción de cloraminación, donde NaClO provoca alteraciones biosintéticas en el metabolismo celular que conllevan a la muerte bacteriana. El grupo HClO (ácido hipocloroso) oxida los grupos sulfhidrilo de la pared bacteriana, provocando la formación de cloraminas dentro del sistema de enzimas bacterianas, alterando así el metabolismo del microorganismo por acción oxidativa¹⁹¹. Esto provoca la degradación y destrucción de fosfolípidos y ácidos grasos, conllevando una inactivación enzimática irreversible en las bacterias y por tanto su muerte¹⁹² (**Figura 2.2.**).

¹⁸⁶ Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49:175-7.

¹⁸⁷ Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod* 2009;35:711-4.

¹⁸⁸ Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34:300-7.

¹⁸⁹ Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* 2006;32:434-7.

¹⁹⁰ Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medication. *J Endod* 2005;31:30-6.

¹⁹¹ Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal in vitro. *Int Endod J* 1997;30:279-82.

¹⁹² Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113-7.

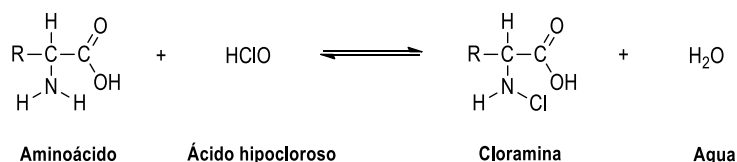


Figura 2.2. Mecanismo de acción del NaClO

Además de su amplia actividad antimicrobiana, es un agente económico y fácil de obtener, y es el mayor disolvente de materia orgánica¹⁹³. Dentro del sistema de conductos radiculares, ha demostrado ser capaz de disolver el tejido pulpar, tanto vital como necrótico¹⁹⁴ y las fibras de colágeno¹⁹⁵. La reacción química responsable de esta función es conocida como saponificación. NaClO actúa como un disolvente de materia orgánica degradando triglicéridos y transformándolos en sales de ácido graso libres (jabón) y glicerina (alcohol)¹⁹⁶.

Entre sus inconvenientes destaca su toxicidad en caso de extrusión al periápice¹⁹⁷ y su ineffectividad en la eliminación del barrillo dentinario formado en el conducto radicular durante la preparación, ni los debris de dentina^{198,199}. Estos restos acumulados durante el tratamiento pueden actuar como barrera para la difusión correcta del NaClO por la anatomía del sistema de conductos radiculares e inactivar o disminuir su actividad antimicrobiana²⁰⁰. Se ha revelado que la dentina tiene un efecto inhibitorio sobre la capacidad antibacteriana de NaClO²⁰¹. Además, carece de sustentividad²⁰².

¹⁹³ Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:756-62.

¹⁹⁴ Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34:424-8.

¹⁹⁵ Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin of North America* 2010;54:291-312.

¹⁹⁶ Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113-7.

¹⁹⁷ Gerhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 2004;37:272-80.

¹⁹⁸ Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 1992; 18:605-12.

¹⁹⁹ Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:359-76.

²⁰⁰ Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis* infected dentin. *J Endod* 2013;39:1395-400.

²⁰¹ Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *Int Endod J* 2000;33:126-31.

²⁰² White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997;23:229-31.

La acción biológica del hipoclorito también depende de distintas variables a tener en cuenta como la concentración, el pH y en endodoncia, además, el volumen y tiempo de irrigación. Estos aspectos se describen a continuación:

1. Concentración: La concentración de soluciones de NaClO es la cantidad de cloro libre disponible por volumen de disolución. Comercialmente NaClO está disponible como solución acuosa a concentraciones que varían desde el 1% al 15% y un pH alcalino con valores de alrededor 11-12²⁰³. En endodoncia se ha utilizado a diferentes concentraciones, desde 0,5% al 6%, siendo su efecto antimicrobiano y la disolución de materia orgánica dependiente de su concentración²⁰⁴ e inversamente proporcional a la compatibilidad biológica^{205,206}. A una concentración del 1% NaClO presenta una compatibilidad biológica aceptable²⁰⁷.

2. pH: El pH de la disolución de NaClO determina el efecto biológico. A pH alcalino la capacidad de disolución que posee el NaClO es mayor, interfiriendo en la integridad de la membrana citoplasmática celular lo que provoca una inhibición enzimática irreversible y su degradación²⁰⁸. A pH más bajo su acción bactericida es mayor^{209,210,211}.

3. Volumen y tiempo de irrigación: Para que sea efectiva la función biológica del NaClO debe existir un equilibrio entre el cloro libre disponible en la solución, lo cual lo constituye el ion hipoclorito y el ácido hipocloroso (HClO) en el interior del conducto radicular, NaClO reacciona con el contenido orgánico presente en el mismo, como el tejido pulpar, las biopelículas bacterianas, el barrillo dentinario y los debris generados durante la instrumentación, lo que causa una reducción del cloro libre disponible resultando en una degradación proteica, aumento de la temperatura y cambios en el pH, desfavoreciendo sus propiedades. Debido a la pérdida de cloro libre, es

²⁰³ Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:597-610.

²⁰⁴ Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Texeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34:424-8.

²⁰⁵ Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J* 2000;33:186-93.

²⁰⁶ Hales JJ, Jackson CR, Everett AP, Moore SH. Treatment protocol for the management of a sodium hypochlorite accident during endodontic therapy. *Gen Dent* 2001;49:278-81.

²⁰⁷ Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113-7.

²⁰⁸ Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113-7.

²⁰⁹ Camps J, Pommel L, Aubut V, Verhille B, Satoshi F, Lascola B *et al*. Shelf life, dissolving action, and antibacterial activity of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:66-73.

²¹⁰ Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:295-8.

²¹¹ Bloomfield SF, Miles GA. Antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium-hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol* 1979;46:65-73.

necesario refrescar las soluciones de NaClO en el interior del conducto radicular mediante una irrigación constante durante el tratamiento. Por tanto, entre las opciones para mejorar la capacidad de disolver restos orgánicos por NaClO, se encuentran las siguientes variables: La concentración del NaClO, temperatura, tiempo de contacto, agitación, área de contacto y pH²¹². Un tiempo de irrigación de 3 minutos con NaClO, esta aceptado por diversos autores como un tiempo óptimo para la erradicación de biopelículas de *E. faecalis*^{213,214,215}.

2.2.2. CLORHEXIDINA

Clorhexidina (CLX) es una bis-biguanida de amplio espectro bacteriano²¹⁶. Estructuralmente es una molécula bicatiónica con dos anillos simétricos de 4-clorofenilo y dos grupos bis-biguanida conectados por una molécula central de hexametileno. Se caracteriza por ser una molécula hidrófoba y lipófila que se disocia formando soluciones con iones de carga positiva que interactúan con fosfolípidos y lipopolisacáridos de la membrana bacteriana, entrando en la célula a través de algún mecanismo de transporte pasivo o activo. Su eficacia se debe a la interacción entre la molécula de CLX (carga positiva) y los grupos fosfato de las paredes bacterianas (carga negativa), lo que altera el equilibrio osmótico de los microorganismos aumentando la permeabilidad de la pared celular y permitiendo que la molécula de CLX pueda penetrar en la pared bacteriana^{217,218}.

Es efectiva, principalmente, frente a bacterias Gram-positivas y en menor medida frente a Gram-negativas²¹⁹, no es viricida ni esporicida, ni activa frente a bacterias ácido alcohol resistentes. Tiene relativa actividad frente a hongos, siendo más efectiva frente a *C. albicans*²²⁰. Su mecanismo de acción antimicrobiano depende de la concentración usada. A bajas concentraciones (0,2%) causa un efecto bacteriostático y a concentraciones más altas como al 2%, CLX es bactericida²²¹.

²¹² Moorer W, Wesselink P. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982;15:187–96.

²¹³ Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138–41.

²¹⁴ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. *J Endod* 2014;40:1999–2002.

²¹⁵ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA. Antimicrobial activity of chlorhexidine, peracetic acid and sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 2015;48:1188–93.

²¹⁶ Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39: 878–85.

²¹⁷ Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod* 1995;21:513–5.

²¹⁸ Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003;36:75–85.

²¹⁹ Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977;85:255–65.

²²⁰ Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009; 42:288–302.

²²¹ Ryan S. Chlorhexidine as a canal irrigant: a review. *Compend Contin Educ Dent* 2010;31:338–42.

Su estructura catiónica, le ofrece una propiedad muy importante que es la sustantividad^{222,223}. Así, diversos estudios demuestran su capacidad para ser adsorbida por las superficies aniónicas como la mucosa oral, la placa dental localizada sobre los dientes, las glucoproteínas salivares o las membranas mucosas²²⁴ y las paredes de la dentina, proporcionando efectos antimicrobianos de larga duración^{225,226}. Algunos estudios²²⁷ muestran una correlación directa entre la concentración de CLX y su sustantividad, mientras que otros²²⁸ afirman que la sustantividad de CLX depende de la capacidad de la dentina para adsorberla durante la primera hora de aplicación. Esta capacidad de sustantividad no ha sido observada en NaClO₂²²⁹. Ferrer-Luque *et al.*²³⁰ observaron que la solución CLX 2% posee un efecto antimicrobiano residual durante un período de 50 días después de 1 minuto de contacto. Con un tiempo de contacto más largo (por ejemplo, durante la preparación del conducto radicular), Souza *et al.*²³¹ observaron la presencia de CLX después de 90 días. Además, CLX ha mostrado ser capaz de inhibir la adhesión bacteriana a la dentina humana²³².

Cuando se compara con otras soluciones usadas en endodoncia como hipoclorito de sodio, CLX es menos tóxica para el tejido periapical^{233,234} y permanece activa a un pH entre 5-8. Además, las reacciones alérgicas son raras²³⁵. Gracias a estas propiedades se ha propuesto como un buen

²²² Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:488–92.

²²³ Baca P, Junco P, Arias Molíz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque C.M. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J Endod* 2012;38:927–30.

²²⁴ Rolla G, Baastad KL. Chlorhexidine—a new remedy in tooth care? *Nor Tannlaegeforen Tid*. 1970;80:248-55.

²²⁵ White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997;23:229–31.

²²⁶ Ferrer-Luque MC, Arias-Molíz TM, Ruiz-Linares M, Martínez García ME, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* infected root canals. *Int J Oral Sci* 2014;6:46–9.

²²⁷ Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009;42:288-302.

²²⁸ Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003;29:565-6.

²²⁹ Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: *in vivo* study. *J Endod* 2004;30:84–7.

²³⁰ Ferrer-Luque MC, Arias-Molíz TM, Ruiz-Linares M, Martínez García ME, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *Int J Oral Sci* 2014;6:46–9.

²³¹ Souza M, Cecchin D, Farina AP, Leite CE, Cruz FF, Pereira CC. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod* 2012;38:1249–52.

²³² Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod* 2008;34:850–4.

²³³ Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994;20:276-8.

²³⁴ Onçağ O, Hosgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423-32.

²³⁵ Garvey LH, Roed-Petersen J, Husum B. Anaphylactic reactions in anaesthetised patients—four cases of chlorhexidine allergy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:1290-4.

irrigante endodóntico^{236,237,238} como complemento en la irrigación final del conducto radicular a una concentración del 2%^{239,240,241,242}, pero no es capaz de disolver el tejido orgánico e inorgánico y se inactiva en presencia de materia orgánica²⁴³. Por ello y debido a su menor acción sobre bacterias Gram-negativas²⁴⁴, no se recomienda como irrigante principal en endodoncia.

2.2.3. ALEXIDINA

Alexidina (ALX) es otra bis-biguanida similar a clorhexidina (CLX) que difiere químicamente de ésta en que posee dos grupos etilhexil hidrofóbicos en su estructura. Comparada con CLX tiene una actividad bactericida de acción más rápida²⁴⁵. Posee una mayor afinidad por los factores de virulencia de las bacterias como los lipopolisacáridos y ácidos lipoteicoicos de la membrana celular^{246,247}. ALX induce la separación de fase lipídica en las membranas bacterianas, lo que aumenta su acción bactericida²⁴⁸. Ha sido usada previamente como colutorio²⁴⁹ y solución desinfectante de lentes de contacto²⁵⁰. Se ha estudiado como agente desinfectante cavitario, consiguiéndose una erradicación frente a biopelículas de *S. mutans* de 99,99% con ALX a concentraciones del 2% y 1% durante un minuto de exposición²⁵¹.

²³⁶ Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod 1999;25:167-71.

²³⁷ Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;99:768-72.

²³⁸ Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. Dent Mater 2010;26:779-85.

²³⁹ Gomes BPPA, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 2001; 34:424-8.

²⁴⁰ Zehnder M. Root Canal Irrigants. J Endod 2006;32:389-98.

²⁴¹ Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod 1994;20:276-8.

²⁴² Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. J Endod 2000;26:315-7.

²⁴³ Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J 2009;42:288-302.

²⁴⁴ Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. Scand J Dent Res 1977;85:255-65.

²⁴⁵ McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev 1999;12:703-15.

²⁴⁶ Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. J Antimicrob Chemoth 2008;62:730-7.

²⁴⁷ Kim HS, Zhu Q, Han SH, Jung IY, Son WJ, Chang SW *et al*. Chemical interaction of alexidine and sodium hypochlorite. J Endod 2012;38:112-6.

²⁴⁸ Baker PJ, Coburn RA, Genco RJ, Evans RT. Structural determinants of activity of chlorhexidine and alkyl bisbiguanides against the human oral flora. J Dent Res 1987;66:1099-106.

²⁴⁹ Roberts WR, Addy M. Comparison of the bisbiguanide antiseptics alexidine and chlorhexidine: I. Effect on plaque accumulation and salivary bacteria. J Clin Periodontol 1981;8:213-9.

²⁵⁰ Yanai R, Ueda K, Nishida T, Toyohara M, Mori O. Effects of tonicity-adjusting and surfactant agents on the antimicrobial activity of alexidine. Eye Contact Lens 2011;37:57-60.

²⁵¹ Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;20:13:41.

También ha sido investigada para su posible uso como irrigante en endodoncia, ya que esa diferencia con CLX en su estructura química, hace que no interaccione con el hipoclorito de sodio, formando precipitados insolubles como para-cloroanilina^{252,253}. Kim *et al.*²⁵⁴ mostraron que ALX al 1% era igual de efectiva que CLX 2% frente a biopelículas de *E. Faecalis*. Su efecto antibacteriano es concentración dependiente²⁵⁵. Además, tiene probada sustantividad²⁵⁶. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce su acción frente a biopelículas polimicrobianas.

2.2.3. CETRIMIDA

Los agentes activos superficiales o surfactantes son moléculas que contienen un segmento liposoluble y otro hidrosoluble que le permiten ocupar la interfase entre la fase acuosa y lipídica. En función de la carga iónica de la superficie de la molécula, los surfactantes se clasifican en aniónicos cuando la carga molecular es negativa; catiónicos, positiva; no iónicos, no hay carga y en los anfóteros cuando existen cargas tanto positivas como negativas²⁵⁷. Concretamente, los surfactantes catiónicos destacan por dos propiedades importantes. Por una parte, se adsorben sobre sustratos cargados negativamente produciendo una capa hidrófoba que aumenta el ángulo de contacto con el agua, reduciendo, de este modo, la tensión superficial de los líquidos. Por otro lado, los surfactantes catiónicos del tipo amonio cuaternario tienen acción antiséptica y bactericida²⁵⁸.

Cetrimida (CTR) o bromuro de cetiltrimetilamonio es un surfactante catiónico derivado del amonio cuaternario que posee una alta actividad bactericida sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, teniendo también actividad antifúngica²⁵⁹.

²⁵² Kim HS, Han SH, Oh SR, Lim SM, Gu Y, Kum KY. Analysis of para-chloraniline after chemical reaction between alexidine and sodium hypochlorite using TOF-SIM spectrometry: a preliminary study. *J Kor Acad Cons Dent* 2010;35:295–301.

²⁵³ Kim HS, Zhu Q, Han SH, Jung IY, Son WJ, Chang SW *et al.* Chemical interaction of alexidine and sodium hypochlorite. *J Endod* 2012;38:112–6.

²⁵⁴ Kim HS, Chang SW, Baek SH, Han SH, Lee Y, Zhu Q *et al.* Antimicrobial effect of alexidine and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* infection. *Int J Oral Sci* 2013;5:26–31.

²⁵⁵ Machado Silveira LF, Baca P, Arias-Moliz MT, Rodríguez Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of alexidine alone and associated with N-acetylcysteine against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Int J Oral Sci* 2013;5:146-149.

²⁵⁶ Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruíz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. *J Endod* 2013;39:1413–5.

²⁵⁷ Vittal R, Gomathi H, Kim KJ. Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes. *Adv Colloid Interface Sci* 2006;31:55-68.

²⁵⁸ Merianos JJ. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. En: Block SS, (ed.), *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991; 225–62.

²⁵⁹ Järvinen H, Pienihäkkinen K, Huovinen P, Tenovuori J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to antimicrobial agents after short-term oral chlorhexidine treatments. *Eur J Oral Sci* 1995;103:32-5.

Actúa sobre las membranas bacterianas reaccionando con los componentes fosfolipídicos provocando la disrupción de la membrana citoplasmática y lisis por estrés osmótico²⁶⁰. Además, la carga positiva de los surfactantes catiónicos genera un efecto biocida sobre las células microbianas²⁶¹ ya que cambia el signo de la superficie celular de negativo a positivo y estas mueren²⁶². En el caso de las biopelículas, este cambio electrostático desestabiliza las fuerzas cohesivas que mantienen la integridad de la estructura, originando la eliminación de la misma^{263,264}. En las concentraciones utilizadas no son tóxicos.

CTR al 0,2% ha mostrado actividad antimicrobiana frente a biopelículas de *S. mutans* en dentina consiguiendo erradicar el 100% en los especímenes tratados²⁶⁵. También ha sido utilizada como irrigante en el tratamiento de conductos asociado a otros agentes antimicrobianos como CLX. Además de erradicar biopelículas de *E. Faecalis in vitro*²⁶⁶ y *ex vivo*²⁶⁷, muestra actividad antimicrobiana residual a largo plazo²⁶⁸. Tiene la ventaja de ser muy poco irritante y reduce la tensión superficial de los líquidos, favoreciendo la entrada de éstos a lugares de difícil acceso como es el caso de los túbulos dentinarios²⁶⁹. Estas características justifican su inclusión como componente de soluciones irrigadoras usadas en endodoncia tales como QMiX®, Cetrexidin®, SmearClear®, REDTA® y EDTAC®, entre otras.

Cuando se combina con CLX se ha demostrado que existe sinergismo ya que ambos actúan sobre la pared celular de las bacterias²⁷⁰. Shen *et al.*²⁷¹ mostraron que la adición de un surfactante a CLX, mejoraba la efectividad frente a biopelículas polimicrobianas frente a CLX sola.

²⁶⁰ Russell AD, Chopra I. Understanding antibacterial action and resistance. 2ª Ed. Ellis Horwood. Chichester;1996.

²⁶¹ Kugler R, Bouloussa O, Rondelez F. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology* 2005;151:1341–8.

²⁶² Campanhã MTN, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. *J Lipid Res* 1999;40:1495–500.

²⁶³ Cloete TE, Jacobs L, Brözel VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation* 1998;9:23-37.

²⁶⁴ Simoes M, Pereira MO, Vieira MJ: Effects of mechanical stress on biofilms challenged by different chemical. *Water Res* 2005, 39:5142–52.

²⁶⁵ Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014;20:13:41.

²⁶⁶ Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, González- Rodríguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod* 2010;36:87-90.

²⁶⁷ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J Endod* 2012;38:927-30.

²⁶⁸ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González- Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod* 2011;37:363-6.

²⁶⁹ Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod* 2006;32:1091-3.

²⁷⁰ Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-41.

²⁷¹ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three dimensional quantitative analysis. *J Endod* 2009;35:981–5.

2.3. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL.

Tradicionalmente el estudio de la microbiota endodóntica se ha llevado a cabo mediante diversas técnicas rutinarias, fundamentalmente mediante la siembra en medios de cultivo adecuados y su posterior recuento²⁷². Hay que tener en cuenta que estos medios de cultivo selectivos y no selectivos, permiten el crecimiento de un número limitado de especies bacterianas, y no ofrecen información suficiente de aquellas especies no cultivables, pero presentes, que podían llegar a representar las especies más prevalentes o numerosas de la enfermedad. Aproximadamente el 50% de la flora oral no es cultivable²⁷³.

Además, los métodos clásicos de cultivo microbiológico, sólo detectan bacterias cultivables, en forma de colonias. Sin embargo, las bacterias en estado latente o viable, pero no cultivable, no crecen ni desarrollan colonias en los medios bacteriológicos comunes. Sin embargo, están vivas y aunque en este estado normalmente muestran niveles muy bajos de actividad metabólica, son capaces de reactivarla si acceden nuevamente a nutrientes en el medio²⁷⁴. Hoy día, y gracias a recientes métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis secuencial de genes 16S rRNA, sabemos que la diversidad microbiana en el desarrollo de infección pulpar y periapical es más complejo de lo que se pensaba previamente. Es el resultado de una infección polimicrobiana provocada por una o más de las más de 700 especies bacterianas que han sido identificadas en la cavidad oral humana, algunas de las cuales aún no han sido cultivadas²⁷⁵.

Todo lo anterior, junto al creciente reconocimiento de la importancia de las biopelículas en las enfermedades infecciosas, ha hecho necesario el desarrollo de nuevas técnicas como la microscopía láser confocal (MLC), que permiten la visualización y cuantificación de las bacterias en su estado fisiológico. Estas técnicas de microscopía junto a la tinción de la muestra con compuestos químicos conocidos como fluorocromos, son capaces de emitir fluorescencia cuando son excitados con luz a una longitud de onda adecuada²⁷⁶. Permiten la diferenciación de bacterias

²⁷² Flach N, Böttcher DE, Parolo CC, Firmino LB, Malt M, Lammers ML *et al*. Confocal microscopy evaluation of the effect of irrigants on *Enterococcus faecalis* biofilm: An *in vitro* study. *Scanning* 2016;38:57-62.

²⁷³ Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5721–32.

²⁷⁴ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture. *J Endod* 2010;36:1820–3.

²⁷⁵ Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721–32.

²⁷⁶ Al-Ahmad A, Follo M, Selzer AC, Hellwig E, Hannig M, Hannig C. Bacterial colonization of enamel *in situ* investigated using fluorescence *in situ* hybridization. *J Med Microbiol* 2009;58:1359–66.

viables y no viables^{277,278}, basándose en la permeabilidad de la membrana, ofreciendo la posibilidad de comparar la distribución y el porcentaje de bacterias vivas/muertas después de un tratamiento²⁷⁹.

La microscopía láser confocal es una técnica de observación microscópica de fluorescencia que ofrece ciertas ventajas sobre la microscopía óptica convencional. Entre ellas destacan²⁸⁰:

1. Mayor resolución de imagen e incremento de la resolución axial (profundidad): de esta manera, es posible realizar secciones ópticas de la muestra.
2. Reconstrucción tridimensional: a partir de las secciones ópticas, es posible aplicar técnicas de reconstrucción tridimensional que nos permiten visualizar las estructuras.
3. Mayor contraste: debido a que se elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco.
4. Análisis de imágenes: al obtenerse éstas de forma electrónica es posible digitalizarla y analizarlas.

El principio de la MLC fue desarrollado en un principio por Minsk en 1957²⁸¹ y los primeros microscopios que validaron esta técnica fueron descritos por Petran *et al.*²⁸² en 1968, pero su mayor desarrollo ha tenido lugar en estas últimas décadas gracias a los nuevos láseres y el progreso de la informática.

El método de trabajo del microscopio confocal es por epi-iluminación, es decir con muestras que al incidir la luz sobre ellas reflejan toda o parte de la luz incidente (microscopía de reflexión), o emiten luz en una longitud de onda superior (microscopía de fluorescencia). El primer caso se suele utilizar con muestras opacas, principalmente en estudios de materiales, mientras que la fluorescencia se utiliza principalmente con muestras biológicas. El principio de epi-iluminación se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco.

²⁷⁷ Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A. Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *J Med Microbiol* 2010;59:1–7.

²⁷⁸ Netuschil L, Reisch E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 1998;43:277–85.

²⁷⁹ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture. *J Endod* 2010;36:1820–3.

²⁸⁰ Martínez-Nistal A, Sampedro A, Matsuguchi M. Introducción a la microscopía láser confocal. En: Sampedro A, de los Troyos JR, Martínez-Nistal A. (Eds). *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*. Universidad de Oviedo, Servicio de publicaciones: 1995:19.

²⁸¹ Minsk M. *Microscopy Apparatus*. USA: 1957: United States Patent 3013467.

²⁸² Petran M, Hadravsky M, Egger D, Galambos R. Tandem scanning reflected light microscope. *J Opt Soc Am* 1968;58:660–4.

Para ello utiliza una fuente de iluminación láser que al atravesar un pequeño orificio se convierte en una luz puntual, que define la profundidad del campo y se enfoca sobre la muestra a observar mediante una lente²⁸³. Por tanto, la utilización de un láser como fuente de luz permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con una gran intensidad (**Figura 2.3**).

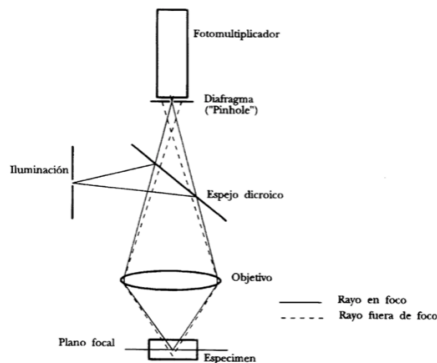


Figura 2.3. Esquema del principio de la microscopía confocal. La luz procedente de los puntos fuera del plano focal es eliminada por el diafragma o *Pinhole*. Imagen tomada de Sampedro A²⁸⁴.

La longitud de onda del láser debe corresponder con la longitud de onda de excitación del fluorocromo que tiñe la muestra, para su visualización. La eficiencia es máxima cuando la longitud de onda del láser coincide con el pico del espectro de excitación del fluorocromo. Como consecuencia, las células emiten luz que es enfocada por una segunda lente hacia otro pequeño orificio, localizado enfrente del detector. Por tanto se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de planos inferiores y superiores²⁸⁵.

Debido a que sólo se ilumina una pequeña zona de la muestra, para su análisis completo se hace necesario un sistema de barrido para poder visualizarla en su totalidad, permitiendo muestrear todas las zonas, junto con un sistema de recopilación de dichas imagen donde se recoge la información de cada una de estas zonas. Este tipo de microscopio confocal en el que el haz del

²⁸³ Pawley JB. Fundamental limits in confocal microscopy. En: James B. Pawley (Eds). Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3º ed. New York: Springer Verlag; 2006;1:5.

²⁸⁴ Martínez-Nístal A, Sampedro A, Matsuguchi M. Introducción a la microscopía láser confocal. En: Sampedro A, de los Troyos JR, Martínez-Nístal A. (Eds). Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría. Universidad de Oviedo, Servicio de publicaciones: 1995:16.

²⁸⁵ Boyde A. Confocal optical microscopy. Microscopy and analysis. New York: Springer Verlag 1998:7-13.

láser barre la muestra es denominado Microscopio láser confocal, en términos anglosajones, *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM), debido a que el láser necesita un tiempo para barrer la imagen, y ésta no pueda ser visualizada de manera instantánea en el monitor. Esta técnica presenta como principal ventaja el permitir la observación de una zona tan grande como se desee sin tener que ceñirse al campo visual del objetivo, además debido a que el haz permanece estacionario, se tiene una iluminación axial constante²⁸⁶.

APLICACIONES EN BIOPELÍCULAS BACTERIANAS

Las aplicaciones de la microscopía confocal para el estudio de biopelículas presenta una ventaja principal ya que permite el análisis de la biopelícula *in situ*, sin alterar su estructura, manteniéndola hidratada sin necesidad de fijación o secado²⁸⁷. Esto ocurre gracias a la identificación de la viabilidad bacteriana por fluorescencia, que tras la tinción de la muestra mediante fluorocromos se puede observar la viabilidad en la biopelícula, así como su cuantificación mediante análisis de imágenes computarizado²⁸⁸.

Diversos estudios aceptan este método para la cuantificación bacteriana ya que es un método simple, exacto, reproducible y muy sensible para la cuantificación de microorganismos²⁸⁹.

Los diferentes fluorocromos presentan una serie de características que son importantes desde el punto de vista de su aplicación:

1. Permeabilidad: es una de las propiedades más relevantes de estas moléculas, ya que algunas de ellas no pueden atravesar la membrana citoplasmática de las células viables, mientras que otros difunden fácilmente hacia el citoplasma celular, donde son detectados, incluso a concentraciones muy bajas.
2. Interacciones específicas. Otra característica propia de algunos fluorocromos es su interacción específica con alguna macromolécula celular, como los ácidos nucleicos.

²⁸⁶ Martínez-Nistal A, Sampedro A, Matsuguchi M. Introducción a la microscopía láser confocal. En: Sampedro A, de los Troyos JR, Martínez-Nistal A. (Eds). Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría. Universidad de Oviedo, Servicio de publicaciones: 1995:17.

²⁸⁷ Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002;15:167–193.

²⁸⁸ Pan P, Barnett ML, Coelho J, Brogdon C, Finnegan MB. Determination of the *in situ* bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. J Clin Periodontol 2000;27:256–61.

²⁸⁹ Hahnel S, Rosentritt M, Burgers R, Handel G. Surface properties and *in vitro* *Streptococcus mutans* adhesion to dental resin polymers. J Mater Sci Mater Med 2008;19:2619–27.

3. Capacidad de retención en la célula. Es el tiempo que queda retenido en el citoplasma celular.
4. Fluorescencia en función del pH, para algunos fluorocromos la emisión de fluorescencia es dependiente pH, por lo tanto es otra característica que se debe de considerar.

Actualmente el estudio de viabilidad bacteriana se basa en la aplicación conjunta de dos fluorocromos en la misma muestra donde solamente una molécula fluorescente es retenida por bacterias no viables, haciendo una discriminación fisiológica celular y un recuento de células vivas y muertas. Para ello, se utilizan reactivos que se comercializan como Live/Dead (Baclight; Invitrogen, Eugene, OR, USA), que diferencian entre bacterias viables y no viables. Son fluorocromos que tiñen los ácidos nucleicos, diferenciando las células vivas de las muertas en base a la integridad de la membrana plasmática celular²⁹⁰. Una de las parejas de fluorocromos que aplicadas conjuntamente permite esta discriminación es la de SYTO-9/Yoduro de Propidio (IP). IP es un fluorocromo impermeable, por tanto sólo atraviesa membranas celulares dañadas, es decir, en las células muertas e interacciona con los ácidos nucleicos, emitiendo fluorescencia roja (Emisión: 617 nm). SYTO-9 tiene la capacidad de penetrar en las membranas biológicas intactas, por tanto en células vivas. Así, la aplicación simultánea de ambos fluorocromos genera una fluorescencia roja en bacterias muertas gracias a IP que elimina la fluorescencia de SYTO 9 en la unión al ácido, pero no penetra en la célula viva, por tanto esta se tiñe verde gracias a SYTO-9. La respectiva emisión y absorción de longitudes de onda son de 494/518 nm para Syto-9 y 536 / 617 nm para IP.

El microscopio láser confocal explora la distribución y estructura de las biopelículas en 2-D y 3-D, produciendo cantidades relativamente grandes de datos de imagen de alta resolución. La cantidad de datos adquiridos por MLC requiere métodos automáticos de análisis de imágenes que sean precisos y ahorren tiempo, para que la información visual pueda ser transformada en números. Esto último, se realiza mediante el tratamiento de los datos con software determinados (ref chaves de paz). Uno de estos novedosos programas es *biolmage_L*²⁹¹ diseñado por el Dr. Luis Chávez de Paz, un software de análisis de imágenes para la caracterización automática de la estructura y distribución de biofilms.

²⁹⁰ Palmer RJ, Haagsen JAJ, Neu TR, Sternberg C. Confocal microscopy of biofilms-spatiotemporal approaches. En: James B. Pawley (Eds). Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3º Ed. New York: Springer Verlag; 2006; 51:875.

²⁹¹ Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. Appl Environl Microbiol 2009;75:1734–9.

La novedad de *bioImage_L* es la inclusión de un algoritmo que identifica automáticamente tonalidades de color sin tener que realizar una conversión monocromática previa en canales RGB separados²⁹².

2.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES IRRIGADORAS FRENTE A BIOPELÍCULAS.

Para realizar la revisión de los estudios que evalúan *in vitro* la actividad antimicrobiana frente a biopelículas polimicrobianas y su evaluación mediante MLC se ha realizado una búsqueda medline (2007-2017) con las siguientes estrategias de búsqueda: *Multispecies oral biofilm OR oral biofilm AND (root canal treatment OR disinfection) AND (CLSM OR confocal microscopy)*. En la **tabla 2.1**. se muestran los resultados de los estudios que han evaluado la actividad antimicrobiana de soluciones endodónticas frente a biopelículas polimicrobianas mediante MLC.

²⁹² Chávez de Paz LE. Página web: http://www.bioimager.com/Luis_chavez_de_paz. Acceso el 30 de mayo de 2017.

Tabla 2.1. Resumen de los principales estudios *in vitro* de la actividad de agentes antimicrobianos frente a biopelículas polimicrobianas mediante MLC.

AUTOR	Solución irrigadora/ Tiempo exposición	Sustrato	Inóculo/ Maduración	Resultados
Shen et al. ²⁹³	CLX 2% CLX-PLUS 1, 3 y 10 minutos.	Discos hidroxiapatita y discos de hidroxiapatita con colágeno I bovino.	Placa subgingival de 3 donantes. 3 semanas.	Un modelo de biopelículas multiespecies es mejor para evaluar la eficacia de los irrigantes endodónticos. La evaluación mediante MLC provee un análisis dinámico de la muerte microbiana por estos agentes. Un mayor tiempo de exposición del antimicrobiano conlleva una mayor reducción de la población bacteriana. La mejor actividad la mostró CLX-Plus, en todos los tiempos y en ambas superficies.
Pappen et al. ²⁹⁴	Tetraclean® MTAD MTAD + CTR 0,01%- 0,1%. 0,5,1,3 y 10 minutos.	Discos hidroxiapatita.	<i>E. faecalis</i> Placa subgingival 3 donantes 14 días.	La eliminación de bacterias en estado planctónico es más fácil que en forma de biopelícula. La incorporación de un detergente como CTR a MTAD puede mejorar su potencial antimicrobiano.
Chávez de paz et al. ²⁹⁵	CLX 2,5% EDTA 17% NaClO 1% 5 minutos.	Superficie hidrofílicas con colágeno.	<i>E. faecalis</i> <i>L. paracasei</i> <i>S. anginosus</i> <i>S. gordonii</i> 24 horas.	La estructura y susceptibilidad de la biopelícula a los antimicrobianos se ve afectada por la elección del sustrato. La mejor actividad antibacteriana se logró con NaOCl 1%. CLX 2,5% mostró la mejor actividad antibacteriana sobre las especies de <i>Streptococcus</i> , pero frente a biopelículas de <i>E. faecalis</i> su efecto fue limitado.
Shen et al. ²⁹⁶	CLX 2% CLX-PLUS Con/sin agitación mecánica. 1 y 3 minutos.	Discos de hidroxiapatita con colágeno I bovino.	Placa subgingival de 3 donantes. 2 días y 1,2,3,4 y 12 semanas.	CLX-PLUS independientemente de la agitación mecánica fue más efectiva que CLX 2%, pero existe una relación sinérgica entre la agitación mecánica y el efecto antimicrobiano de CLX. La eficacia frente a biopelículas polimicrobianas es dependiente del tipo de antimicrobiano y del tiempo de exposición del agente, siendo ésta más efectiva a los 3 minutos.

²⁹³ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three dimensional quantitative analysis. J Endod 2009;35:981–5.

²⁹⁴ Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. *In vitro* antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. Int Endod J 2010;43:528–35.

²⁹⁵ Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. J Endod 2010; 36:70–7.

²⁹⁶ Shen Y, Stojicic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. J Endod 2010;36:100–4.

Tabla 2.1. Resumen de los principales estudios *in vitro* de la actividad de agentes antimicrobianos frente a biopelículas polimicrobianas mediante MLC. (continuación)

AUTOR	Solución irrigadora/ Tiempo exposición	Sustrato	Inóculo/ Maduración	Resultados
Shen et al. ²⁹⁷	CLX 2% CLX-PLUS 1,3 y 10 minutos.	Discos de hidroxiapatita modificados con colágeno I bovino.	Placa subgingival de 1 donante. Maduración durante 2 días, 1,2,3,4 y 12 semanas.	Las biopelículas maduras y en condiciones limitadas de nutrientes son más resistentes a CLX con o sin adición de detergentes.
Ordinola-Zapata et al. ²⁹⁸	CLX 2% NaClO 1% Ácido cítrico 10% EDTA 17% Agua destilada 5 minutos.	Bloques dentina bovina 3x3x2mm.	Infección intraoral 1 voluntario . 48 horas.	NaClO 1% fue el único capaz de modificar significativamente la estructura de la biopelícula y reducir el biovolumen total de las muestras infectadas. CLX 2% no tubo diferencias significativas frente al grupo control, tampoco hubo diferencias en el biovolumen total y el biovolumen de la población viable entre todos los demás grupos y el control.
Du et al. ²⁹⁹	CLX 2% Plasma Plasma+CLX 2% 2 y 5 minutos.	Discos dentina bovina.	<i>E. faecalis</i> Muestras microbiológicas de conducto radicular infectado 6 voluntarios. 1 y 3 semanas.	Plasma modificado con CLX 2% mostró la mayor eficacia en los dos cultivos bacterianos en 2 y 5 minutos de exposición. Es recomendable el uso de soluciones combinadas para eliminar mejor la biopelícula.
Yao et al. ³⁰⁰	CLX 1% Peróxido de carbamida 5% - 10%. 1,3 y 10 minutos.	Discos hidroxiapatita con colágeno tipo I.	Placa supragingival de 1 donante. 3 semanas.	Peróxido de carbamida 10% mostró los mejores resultados en cuanto a reducción bacteriana.

²⁹⁷ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37:657–61.

²⁹⁸ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomes de Moraes I, Marciano M *et al.* Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012;45:162–8.

²⁹⁹ Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X *et al.* Effect of Modified Nonequilibrium Plasma with Chlorhexidine Digluconate against Endodontic Biofilms *in Vitro*. *J Endod* 2013;39:1438–43.

³⁰⁰ Yao CS1, Waterfield JD, Shen Y, Haapasalo M, Macentee MI. *In vitro* antibacterial effect of carbamide peroxide on oral biofilm. *J Oral Microbiol* 2013;5:10.3402.

Tabla 2.1. Resumen de los principales estudios *in vitro* de la actividad de agentes antimicrobianos frente a biopelículas polimicrobianas mediante MLC. (continuación)

AUTOR	Solución irrigadora/ Tiempo exposición	Sustrato	Inóculo/ Maduración	Resultados
Ordinola-Zapata et al. ³⁰¹	MTAD, QMiX, Smear Clear, Ác.maleico 7%, Yoduro potásico 2%, Ác.paracético 4%, -NaOCl 2,5% - 5,25%. 5 minutos.	bloques dentina bovina 2x2x2mm.	Placa supragingival de 1 donante. 24 horas.	Los valores más bajos de reducción del biovolumen total fueron para los grupos de NaClO y ácido paracético. La habilidad de disolución del agente es fundamental para la erradicación de la biopelícula.
del Carpio-Perochena et al. ³⁰²	NaClO 1% NaClO 2,5% NaClO 5,25% CLX 2% 5, 15 y 30 minutos.	Bloques dentina bovina.	Placa supragingival de 1 donante. 72 horas.	Los valores más altos en cuanto a la remoción de biovolumen total fueron para NaClO 2,5% y 5,25%, independientemente del tiempo de contacto.
Stojicic et al. ³⁰³	QMiX CLX 2% MTAD NaClO 1% y 2%. 5 y 30 segundos. 3 minutos.	Discos de hidroxiapatita con colágeno I y discos de dentina humana.	<i>E. faecalis</i> Placa supragingival y subgingival de 3 donantes. En forma de biopelícula y planctónico. Maduración durante 21 días.	QMiX y NaClO 2% fueron las soluciones con mejor actividad antimicrobiana frente a <i>E. faecalis</i> en estado planctónico y en biopelícula, así como para biopelículas de placa. QMiX resultó ser entre 2 y 4 veces superior a CLX 2% y NaClO 1%. MTAD fue la solución con peor actividad antimicrobiana. El tipo de sustrato no influyó en los resultados.
Stojicic et al. ³⁰⁴	NaClO 1%, Ioduro potásico 0,2/04% CLX 2% 1 y 3 minutos.	Discos de hidroxiapatita con colágeno tipo I.	Placa supragingival y subgingival de 6 donantes. 1,2,3,4 y 8 semanas.	El porcentaje de bacterias muertas en 1 semana fue significativamente mayor que en las de 3 semanas. La resistencia a su eliminación es menos dependiente de la composición de la flora y más relacionado el tiempo de maduración, independientemente del agente antibacteriano.

³⁰¹ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardineli N, de Moraes IG *et al.* The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontol Scand* 2013;71:424-31.

³⁰² Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Hungaro Duarte MA, de Andrade FB, Cavenago BC, Villas-Bôas MH. Application of laser scanning microscopy for the analysis of oral biofilm dissolution by different endodontic irrigants. *Dent Res J* 2014;11:442-7.

³⁰³ Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J* 2012;45:363-71.

³⁰⁴ Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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* 2013;39:473-7.

Tabla 2.1. Resumen de los principales estudios *in vitro* de la actividad de agentes antimicrobianos frente a biopelículas polimicrobianas mediante MLC. (continuación)

AUTOR	Solución irrigadora/ Tiempo exposición	Sustrato	Inóculo/ Maduración	Resultados
Niazi et al. ³⁰⁵	Tripsina 1% Proteinasa K 1% NaClO 1% CLX 2% 2 minutos.	Discos de hidroxiapatita.	<i>P. acnés</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>A. radidentis</i> <i>S. mitis</i> <i>E. faecalis</i> 3 semanas.	NaClO 1% fue significativamente mejor. Tripsina 1% y proteinasa k 1% redujeron significativamente un mayor porcentaje de biopelículas, respecto al grupo control y CLX 2%.
Wang et al. ³⁰⁶	Péptido 1018 y en combinación con CLX 2%. 1 y 3 minutos.	Discos de hidroxiapatita.	Placa supragingival procedente de un donante. Maduración durante 3 días.	El péptido mostró una eficacia antimicrobiana dependiente de la concentración utilizada. La adición de CLX 2% mejoró significativamente el efecto antimicrobiano del péptido.
Niazi et al. ³⁰⁷	Tripsina 1% Proteinasa K 1% CLX 2% 5 minutos.	Hemisección radicular humana.	<i>P. acnés</i> <i>S. epidermidis</i> <i>A. radidentis</i> <i>S. mitis</i> <i>E. faecalis</i> 3 semanas.	La máxima reducción del biovolumen residual se obtuvo con tripsina al 1% combinada con CLX 2% e irrigación ultrasónica. La combinación de CLX 2% y proteinasa K resultó similar en cuanto a reducción bacteriana que el uso de CLX 2% sola.
Del Carpio-Peroche na et al. ³⁰⁸	NaClO 1% y 2,5% 20 minutos.	Bloques dentina humana.	Placa supragingival procedente de un donante sano. 48 horas.	la acidificación del NaClO mejora su capacidad bactericida; sin embargo, a un pH alcalino es necesario para mejorar su efecto de disolución de materia orgánica.

³⁰⁵ Niazi SA, Clark D, Do T, Gilbert SC, Foschi F, Mannocci F *et al.* The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. *Int Endod J* 2014;47:756-68.

³⁰⁶ Wang Z, de la Fuente-Núñez C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock RE. Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an Anti-Biofilm Peptide. *PLoS One* 2015;10:132512.

³⁰⁷ Niazi SA, Al-Ali WM, Patel S, Foschi F, Mannocci F. Synergistic effect of 2% chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. *Int Endod J* 2015;48:1157-67.

³⁰⁸ del Carpio-Peroche A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AG, Cavenago BC, Marciano MA *et al.* Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multispecies biofilms. *Clin Oral Investig* 2015;19:2067-73.

Tabla 2.1. Resumen de los principales estudios *in vitro* de la actividad de agentes antimicrobianos frente a biopelículas polimicrobianas mediante MLC. (continuación)

AUTOR	Solución irrigadora/ Tiempo exposición	Sustrato	Inóculo/ Maduración	Resultados
Suman et al. ³⁰⁹	Etanol 95% Etanol 95% + CLX 2% Sol. Salina + CLX 2%. Sol. Salina 5 minutos.	Raíces humanas / Bloques dentina bovina.	<i>E. faecalis</i> Placa supragingival. Maduración durante 1 semana para el monocultivo y 24 horas para las biopelículas polimicrobianas.	MLC mostró que la remoción de bacterias viables fue mayor para el grupo Etanol 95%+CLX 2%, pero sin diferencias significativas.
Yang et al. ³¹⁰	CLX 2% NaOCl 2% 3 minutos.	Infección intratubular.	<i>E. faecalis</i> Placa supragingival y subgingival humana. 1 y 3 semanas.	El porcentaje de muerte bacteriana es dependiente de la madurez del biofilm, del agente empleado y si es una biopelícula mono o multiespecies. En biopelículas polimicrobianas NaClO 2% es más efectivo que CHX 2%.
Tawakoli et al. ³¹¹	H ₂ O ₂ 3% CLX 2% EDTA 17% NaClO 5% 1 minuto.	Discos de hidroxiapatita con sobrenadante salivar.	<i>S.mutans</i> <i>S.oralis</i> <i>A. naeslundii</i> 1 semana.	CLX 2% Y H ₂ O ₂ 3% no obtuvieron diferencias significativas respecto al grupo control. EDTA 17% fue significativamente mejor antibacteriano que CHX 2%, H ₂ O ₂ 3% y grupo control. NaClO 5% fue la solución que mostró mejores resultados en cuanto a la eliminación de biovolumen total.
Dostie et al. ³¹²	CLX 1% Ácido ortofosfórico 35% Tetraciclina CTR 0,3%+ CLX 0,1%+ EDTA 0,5% 0,9% NaOCl. 2 minutos.	Discos de SLA con colágeno bovino tipo I	Placa subgingival de varios donantes. 3 semanas.	CLX y ácido ortofosfórico mostraron una reducción bacteriana más significativa: 88,2% y 93,2%. El grupo tetraciclina y el grupo CTR no mostraron diferencias significativas con el control.

³⁰⁹ Suman JM, Kuga MC, Da Rosa RA, Santini MF, Graziotin-Soares R, Montagner F *et al.* Antibacterial Activity of Chlorhexidine After Final Irrigation with Ethanol: CLSM and Culture-Based Method Analysis. *Microsc ResTech* 2015;78:682-7.

³¹⁰ Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J *et al.* Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dental Tubules to Disinfecting Solutions. *J Endod* 2016;42:1246-50.

³¹¹ Tawakoli PN, Ragnarsson KT, Rechenberg DK, Mohn D, Zehnder M. Effect of endodontic irrigants on biofilm matrix polysaccharides. *Int Endod J* 2017;50:153-60.

³¹² Dostie S, Alkadi LT, Owen G, Bi J, Shen Y, Haapasalo M *et al.* Chemotherapeutic decontamination of dental implants colonized by mature multispecies oral biofilm. *J Clin Periodontol* 2017;44:403-9.

Material y Métodos

En la exposición del material y métodos se describen en primer lugar, la obtención de las unidades volumétricas de dentina (UVDs) que servirán de sustrato para la formación de las biopelículas y el procedimiento de recogida de la muestra microbiológica de conductos radiculares infectados con periodontitis periapical. A continuación, se expone la metodología utilizada para infectar los especímenes dentinarios con el inóculo polimicrobiano. Finalmente, se describen los métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras sobre las biopelículas formadas.

3.1. PREPARACIÓN DE LOS ESPECÍMENES DENTINARIOS Y GRUPOS DE ESTUDIO

El protocolo de este trabajo ha sido aprobado por el comité de ética de la Universidad de Granada (UGR- 438). Como sustrato para la formación de las biopelículas polimicrobianas se utilizaron unidades volumétricas de dentina radicular (UVDs). Para ello se seleccionaron 15 dientes unirradiculares humanos sanos que fueron extraídos por razones ortodóncicas. Se excluyeron aquellos que tenían realizado un tratamiento de conductos o que estuviesen fracturados. Los dientes fueron limpiados de sarro y restos orgánicos con la ayuda de una cureta Gracey 56 (Hu-Friedy Europe, Zweigniederlassung Deutschland, Alemania) y se almacenaron hasta su uso en una solución de timol al 0.1% (Panreac química, Barcelona, España) a 4°C (LG Multi Air Flow 804, Electronics España).

La metodología para obtener los bloques dentinarios siguió la metodología previamente descrita por Ma *et al.*³¹³. Los dientes fueron seccionados con una máquina Accuton-50 (Struers, Copenhagen, Dinamarca) con una velocidad de corte de 3.200 rpm e irrigación con abundante de agua. Se descartaron los tercios medio y apical de la raíz y la corona dentaria para obtener una superficie plana de dentina, del tercio coronal radicular. La sección radicular remanente fue cortada siguiendo la luz del conducto radicular, consiguiéndose 2 mitades de cada uno de ellos.

El cemento radicular de cada bloque se eliminó mediante pulido, hasta obtener una superficie plana con discos de papel de carburo de silicio de 150 y 220 grit (Struers, Copenhagen, Dinamarca). La cara interna que correspondía a la luz del conducto se pulió con discos de papel en un orden ascendente de 150, 220, 500, 800, 2000 y 4000 grit, para obtener una superficie pulida, lisa y brillante para facilitar la visualización al microscopio confocal.

³¹³ Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011; 37:1380-5.

Se ajustó el tamaño de cada una de las mitades utilizando un calibrador tipo pie de rey (modelo IP67 Mahr, Esslingen, Alemania) hasta conseguir especímenes de 4×4×0,7mm, que constituyeron lo que denominamos UVDs (**Figura 3.1**).

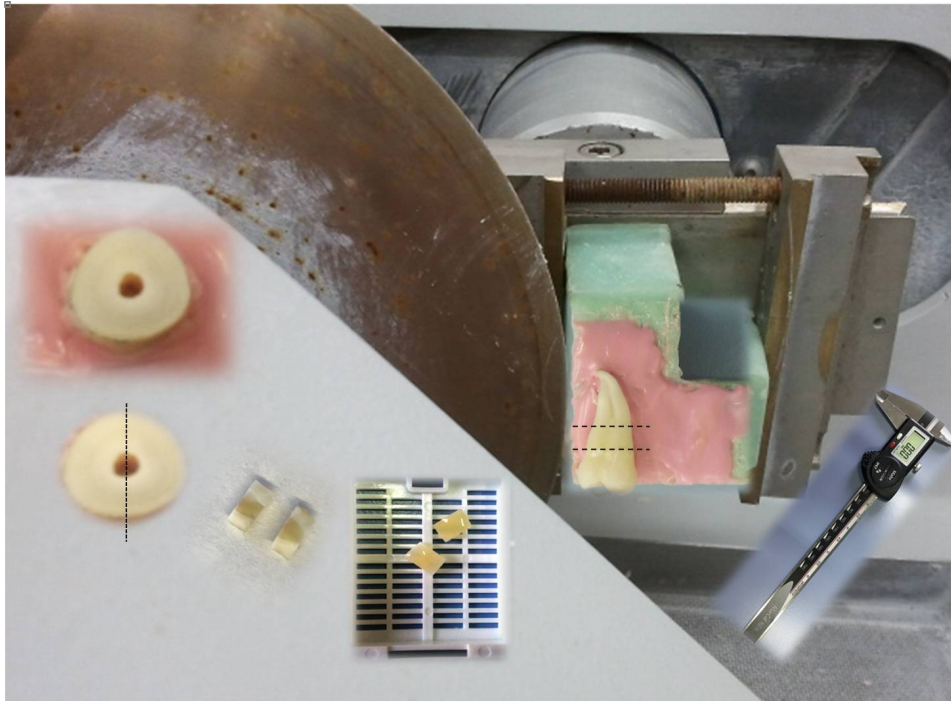
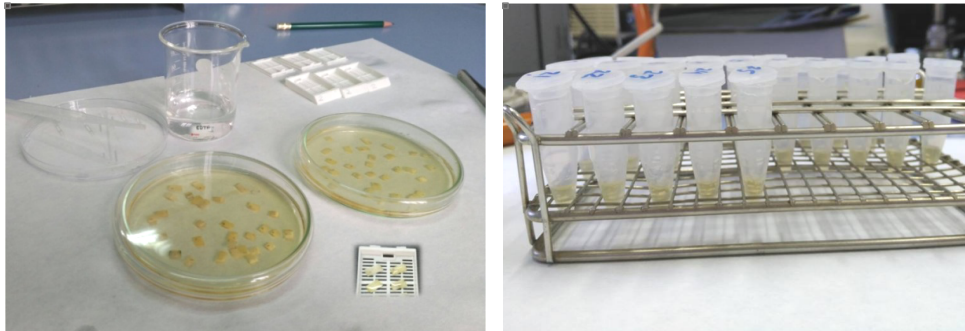


Figura 3.1. Obtención del sustrato dentinario (UVDs) para la formación de las biopelículas microbianas.

El barrillo dentinario formado durante la preparación de los bloques de dentina se eliminó sumergiéndolos en EDTA al 17% durante 5 minutos y lavándolos inmediatamente con solución salina durante 10 minutos. A continuación, se procedió a la asignación en los grupos de estudio. Cada una de las dos mitades radiculares fue asignada aleatoriamente a los diferentes grupos de estudio. El número total de UVDs/grupo fue 4 (**Figura 3.2**).



GRUPOS DE ESTUDIO (n=4/grupo)	SOLUCIONES IRRIGADORAS
1	Control (Agua destilada estéril)
2	Hipoclorito sódico 2,5%
3	Clorhexidina 2%
4	Cetrimida 0,2%
5	Alexidina 2%
6	Clorhexidina 2%+Cetrimida 0,2%
7	Alexidina 2%+Cetrimida 0,2%

Figura 3.2. Asignación de las UVDs en los grupos de estudio.

Posteriormente, los especímenes fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121°C y se incubaron en caldo BHI (Scharlau Chemie SA, Barcelona, Spain) durante 24 horas a 37°C, para asegurar que no había contaminación bacteriana. Finalmente, se conservaron en solución salina estéril hasta que fueron utilizadas.

3.2. INÓCULOS MICROBIANOS PARA LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

3.2.1. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

El inóculo para la formación de la biopelículas consistió en muestras de conductos radiculares necróticos de dientes con periodontitis apical. Previo consentimiento firmado por cada paciente, el proceso empleado para la recogida de la muestra microbiana fue el siguiente:

Se seleccionaron tres pacientes voluntarios con dientes unirradiculares con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis apical susceptibles de tratamiento endodóntico. La toma de muestra en cada paciente se realizó siguiendo una metodología previamente descrita por Rôças y Siqueira³¹⁴, siguiendo una técnica aséptica. Previo aislamiento del campo operatorio mediante colocación de un dique de goma (Roeko FlexiDam, Coltene Whaledent, Langenau, Alemania), se procedió a la limpieza de la placa supragingival de la superficie del diente con cepillado y piedra pómez. A continuación se eliminó la caries y todo el campo operatorio se limpió con peróxido de hidrógeno al 3%, incluyendo el diente, grapa y dique circundante, hasta que no se produjo más burbujeo de peróxido. A continuación todas las superficies se desinfectaron con hipoclorito sódico al 2,5%. Se realizó la apertura cameral del diente afectado con turbina (Bella torque Multiflex 637B kavo dental, Biberach, Alemania) y con una fresa redonda de diamante #201R (Shofu, Kyoto, Japón), estériles. Una vez realizada la apertura cameral, se introdujeron en el interior del conducto, 10 µl de solución salina estéril con cuidado de que no desbordase y una lima Hedström#15 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza) hasta aproximadamente 1mm del ápice, según diagnóstico radiográfico. Seguidamente se realizaron movimientos circunferenciales suaves durante 30 segundos con la lima. A continuación, tres puntas de papel estériles de tamaño #15 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza) fueron colocadas consecutivamente dentro del conducto hasta que absorbieron todo el fluido. Cada punta fue dejada al menos 1 minuto en el interior del conducto e inmediatamente transferidas a un tubo Eppendorf de 1,5 cm³ (Eppendorf Ibérica S.L.U. San Sebastián de los Reyes, Madrid, España), que contenía 500 µl de caldo TSB estéril. Las muestras microbianas fueron transferidas inmediatamente al laboratorio de microbiología de la facultad de Odontología de Granada, para su procesamiento y conservación.

³¹⁴ Rôças I, Siqueira JF Jr. *In vivo* antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod* 2011; 37:304– 10.

3.2.2. MEDIOS DE CULTIVO

TSB

Para la conservación del inóculo se usó caldo tripticasa de soja (TSB), (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) suplementado con glucosa (5gr/L), Hemina 0,005 (g/L) y vitamina K (0,001gr/L). Se preparó añadiendo 37 g de polvo TSB a un vaso de precipitado que contiene 1 litro de agua destilada. Una vez disuelto en ebullición, se esterilizó en autoclave 15 minutos a 121° C.

BHI

El caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) se usó para preparar la suspensión bacteriana inicial a partir de la cual se crearon las biopelículas y para refrescar el medio de crecimiento. Para la preparación del caldo, se añadieron a un vaso de precipitado, 37 g de polvo BHI y 1 litro de agua destilada. Una vez disuelto en ebullición, se esterilizó en autoclave 15 minutos a 121°C. Después de la esterilización el pH del medio era 7,38 ± 0,2. En la preparación de la forma sólida, se incorporaron 15 g de agar al vaso de precipitado y, tras la esterilización, se añadieron 15 ml por tubo y por placa de Petri.

Agar mantenimiento

Es un medio utilizado para el mantenimiento de las bacterias viables. Su composición es la siguiente: 15 g de peptona tripticasa de caseína, 15 g de peptona de soja, 5 g de cloruro sódico, 15 g de agar y 1 litro de agua destilada. Para su preparación se añadieron todos los componentes a un vaso de precipitado. Una vez disueltos en ebullición, se repartieron 10 ml/tubo y se esterizaron en autoclave 15 minutos a 121°C. Posteriormente, los tubos se colocaron inclinados para que quedaran con lengüeta o pico de flauta antes de su solidificación. Después de la esterilización, el pH del medio era 7,2 ± 0,2.

Otros preparados

Para el lavado de las biopelículas y para el grupo control, se usó solución salina 0,9% (9 g de NaClO en 1000 ml de agua destilada), esterilizada previamente durante 20 minutos a 121°C en autoclave.

3.2.3. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

Las muestras microbiológicas obtenidas por los tres pacientes se mezclaron en un nuevo Eppendorf con 500 ml de caldo BHI estéril. Los inóculos se incubaron 24 horas añadiendo posteriormente glicerol estéril hasta alcanzar una concentración del 50%, conservándola a -20°C en este medio³¹⁵. Toda la manipulación se llevó a cabo en una campana de flujo laminar.

Para su uso, se sembraron en BHI, y a partir del cultivo, los inóculos se sembraron en tubos en lengüeta con medio agar mantenimiento y se mantuvo a 4°C para su posterior utilización en las experiencias.

3.2.4. VALIDACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL INÓCULO MICROBIANO

Antes de infectar los especímenes dentinarios para la formación de las biopelículas, se procedió al análisis de la viabilidad celular presente en el inóculo mediante citometría de flujo. Para ello 100 µl de la suspensión microbiana, previamente incubada durante 24 horas, fue introducida en un tubo fino de vidrio que contenía 1 µl de solución isotónica. La mezcla fue marcada con 100 µL de los fluorocromos, SYTO-9 e Ioduro de Propidio (LIVE/DEAD®, BacLight™; Invitrogen, Eugene, OR, USA) según instrucciones del fabricante, con el fin de discriminar las células viables de las no viables (microbios muertos), en base a la integridad de la membrana celular³¹⁶. El tubo fue colocado en el sistema de flujo de FACS (citómetro FACSCANTO II, Becton, Dickinson, Madrid, España) y los resultados fueron analizados por el *software* del citómetro (FACSDiva Versión 6.1.3.), que permite obtener un gráfico de puntos bidimensionales (*dop-plot* o *contour-plot*) donde se representan las diferentes poblaciones celulares, viables y no viables dentro de la muestra microbiológica.

³¹⁵ Rôças I, Siqueira JF Jr. *In vivo* antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. J Endod 2011; 37, 304–10.

³¹⁶ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, *et al.* Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. Int Endod J 2012; 45:162–8.

3.3. INFECCIÓN DE LA DENTINA Y FORMACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS

Tras comprobar la viabilidad bacteriana del inóculo se procedió a la infección de las UVDs. La densidad celular de las suspensiones microbianas se ajustó en un turbidímetro (DensiCHEK plus, biomérieux, Lyon, Francia) a una concentración de aproximadamente 3.0×10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro en caldo BHI³¹⁷.

Placas de microtiter de 24 pocillos (Nunc 163320. Roskilde, Dinamarca), fueron inoculadas con 200 μ L de la suspensión polimicrobiana y 1,8 ml de caldo BHI estéril. Los bloques de dentina estériles se sumergieron en los pocillos de las placas y fueron incubados a 37°C y 95% de humedad relativa durante 3 semanas en una mesa de balanceo y en una atmósfera anaerobia (10% CO₂, 10% N₂ y 80% N₂)³¹⁸ (**Figura 3.3.**). El medio BHI fue refrescado para asegura el crecimiento de las biopelículas una vez por semana³¹⁹.

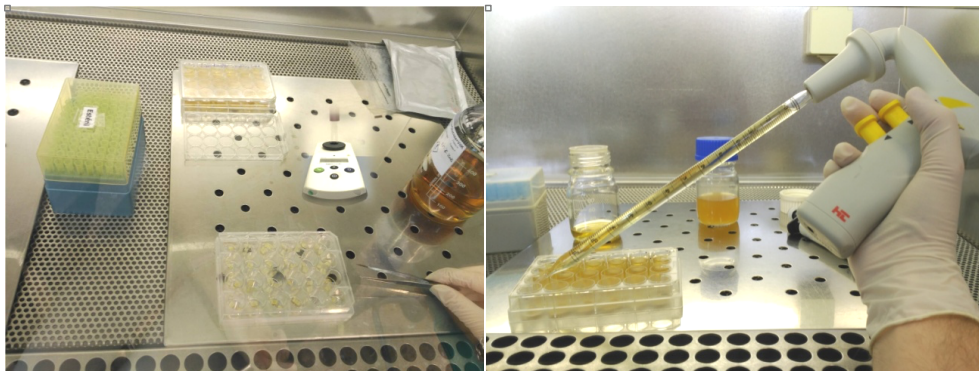


Figura 3.3. Infección de las UVDs para su incubación durante tres semanas.

³¹⁷ Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X, *et al.* Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. J Endod 2013;39, 1438–43.

³¹⁸ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo, M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three-dimensional quantitative analysis. J Endod 2009; 35:981-5.

³¹⁹ Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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 2013; 39:473–7.

3.3.1. VALIDACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS POLIMICROBIANAS

El desarrollo y viabilidad de las biopelículas formadas se comprobó mediante tinción con el kit fluorescente de viabilidad (LIVE/DEAD®, BacLight™; Invitrogen, Eugene, OR, USA)³²⁰ y observación con MLC en dos tiempos. Uno preliminar, a la semana de la infección de las UVDs, en el que se considera la biopelícula aún inmadura y otro definitivo a las tres semanas de incubación, en el que se considera que la biopelícula ha alcanzado su madurez.

Para ello dos especímenes dentinarios adicionales de cada grupo de estudio, fueron teñidos con los fluorocromos SYTO-9 e Ioduro de Propidio y directamente observados con MLC. Los datos de las imágenes escaneadas fueron transferidos y analizados con el software *bioImage_L*³²¹, que permitió cuantificar el porcentaje de células viables y no viables dentro de la muestra. La metodología empleada en cada paso se describe en el apartado 3.6.

Asimismo, tras la visualización al MLC, estos especímenes fueron procesados para su observación mediante microscopía electrónica de barrido (M.E.B) con el fin de verificar el carácter polimicrobiano de las biopelículas. Los especímenes se lavaron en solución salina tamponada estéril y luego se fijaron con una solución de glutaraldehído al 4% durante 24 h. Posteriormente, se deshidrataron en series de etanol graduadas (50, 70, 90 y 100%), se secaron durante 24 horas y se recubrieron por pulverización catódica con paladio de oro. Las muestras se analizaron seguidamente mediante M.E.B (Hitachi, S-510, Japón) a 25 Kv.

3.4. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ANTIMICROBIANAS

Las soluciones se prepararon el mismo día que se realizó cada experiencia, con un tiempo máximo previo a su uso de 60 minutos. La **tabla 3.1.** recoge las soluciones antimicrobianas utilizadas en este estudio incluyendo composición, fabricante y modo de preparación.

³²⁰ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, *et al.* Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012; 45:162–8.

³²¹ Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:1734–9.

Tabla 3.1. Soluciones antimicrobianas utilizadas

Solución empleada	Solución comercial/Fabricante	Preparación
Clorhexidina 2%	Digluconato de clorhexidina al 20% (Guinama, Alboraya, Valencia, España)	Diluir 10 ml de digluconato de CLX al 20% en agua destilada estéril hasta un volumen de 100 ml
Alexidina 2%	Alexidine Dihydrochloride, en polvo al 100%. (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania)	Disolver 0,2 g en 10 mL de etanol al 30% (pH: 2,63)
Cetrimida 0,2%	Cetrimida o bromuro de cetil-trimetil amonio en polvo al 100%. (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania)	Disolver 0,2 g de cetrimida en agua destilada estéril hasta un volumen de 100ml
Hipoclorito sódico 2,5%	Hipoclorito sódico al 10% (Panreac Química, Barcelona, España)	A partir de una solución de NaClO al 10%, previa validación del cloro libre de la solución comercial.
Tiosulfato de sodio al 2,48%	Sodio tiosulfato 5-hidrato, en polvo al 100%. (Panreac Química, Barcelona, España)	disuelta en agua destilada estéril hasta un volumen de 100ml

Todas las soluciones fueron homogeneizadas mediante agitación continua con unas varillas magnéticas y esterilizadas mediante filtros estériles de 0.45 μm (Sarstedt, Filtrpor S 0.45, Nümbrecht, Alemania).

3.5. TEST DE ACTIVIDAD FRENTE A BIOPELÍCULAS POLIMICROBIANAS

Todas las experiencias se realizaron en campana de flujo laminar (Telstar S.A., modelBio-II-B, Terrasa, Spain). Transcurrido el tiempo de incubación y formación de las biopelículas, se procedió a lavar las UVDs en 180 μL de solución salina al 0,9% durante 2 minutos para eliminar las bacterias que no estuviesen fuertemente adheridas a las biopelículas. La actividad antimicrobiana se determinó utilizando una placa de microtiter de 96 pocillos que contenían 100 μL /pocillo de las soluciones antimicrobianas. Las UVDs con las biopelículas ya lavadas fueron secadas con papel absorbente estéril e introducidas en los pocillos y mantenidas en contacto con las soluciones durante 3 minutos (**Figura 3.4.**). Las muestras tratadas con la solución de NaClO, se inactivaron exponiéndolas a 100 μL /pocillo de tiosulfato sódico al 2,48% durante 5 minutos, con el fin de evitar

su interacción con las tinciones de viabilidad³²². Tras el periodo de exposición a las soluciones irrigadoras, los especímenes dentinarios fueron finalmente lavados con solución salina y preparadas para la observación con MLC.

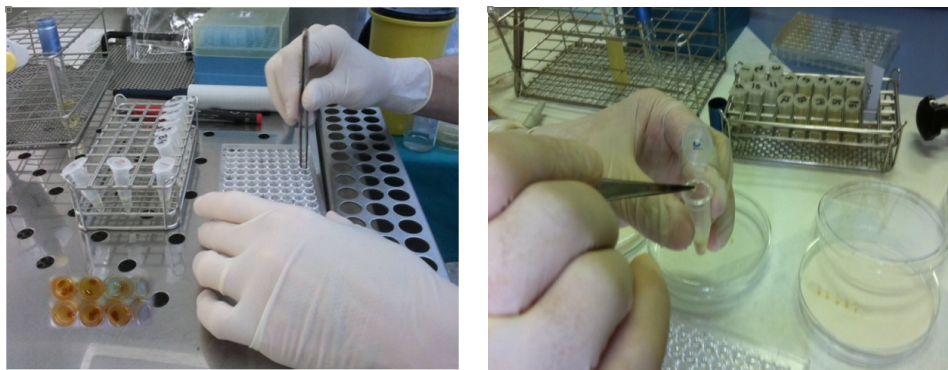


Figura 3.4. Test de actividad antimicrobiana.

3.6. ANÁLISIS MEDIANTE MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL (MLC)

Para el análisis de la desinfección dentinaria mediante MLC, los especímenes dentinarios con las biopelículas formadas, fueron marcados con el kit LIVE/DEAD® (BacLight™; Invitrogen, Eugene, OR, USA) que permite evaluar la integridad de la membrana de las células de la biopelícula. Contiene dos componentes fluorescentes, A y B, consistentes en SYTO-9 e Ioduro de Propidio, respectivamente. SYTO-9 es un colorante fluorescente verde, que tiñe los ácidos nucleicos, independientemente de si los microorganismos están vivos o muertos. El yoduro de propidio (IP) es un colorante rojo fluorescente que sólo tiñe células con la membrana citoplasmática dañada (microbios muertos). Después de la tinción de las muestras con una mezcla 1: 1 de SYTO- 9 y IP durante 15 minutos, a temperatura ambiente y protegidas de la luz, se lavaron con solución salina y fueron montadas sobre placas 60µ-Dish (Ibidi, Martinsried, Germany) con aceite de montaje (BacLight™, Invitrogen) para su observación directa utilizando un microscopio láser confocal

³²² Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, *et al.* Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012; 45:162–8.

invertido (Leica TCS-SP5 II, Mannheim, Alemania) en el servicio de instrumentación científica de la Universidad de Granada, sede Facultad de Farmacia (**Figura 3.5.**).

Las respectivas longitudes de onda de absorción y emisión fueron 494/518 nm para SYTO-9 y 536/617 nm para IP. Para evitar la diafonía fue utilizado el modo secuencial marco. Cinco áreas equidistantes al azar, fueron adquiridas de cada muestra de cada grupo usando una lente de 40×, 1 micra de espesor y un formato de 512×512 píxeles. Cada imagen representa un área de 387×387 μm . La exploración se realizó desde la parte superior de la biopelícula a la superficie de la dentina.

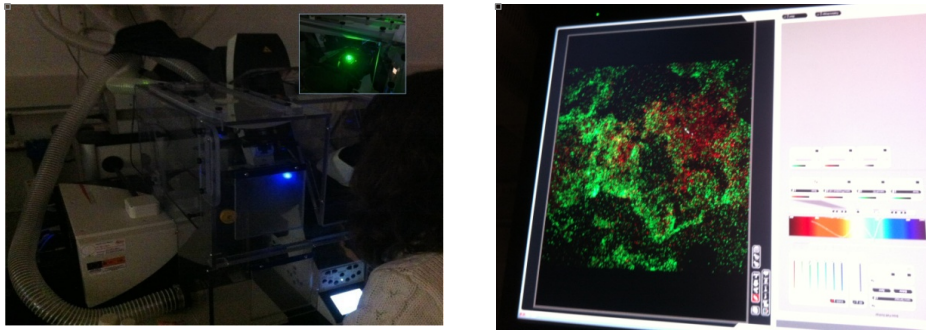


Figura 3.5. Microscopio láser confocal.

La cuantificación de la fluorescencia de las áreas escaneadas se realizó transfiriendo los datos al *software* *bioImage_L*³²³. Este programa permite reconstruir tridimensionalmente y obtener proyecciones máximas planas del total de células presentes en la biopelícula, en cada campo visualizado (**Figura 3.6.**) y cuantificar parámetros tales como el biovolumen total, el biovolumen de población verde (microbios viables) y roja (no viables) (μm^3), así como el porcentaje de estas poblaciones correspondiente del punto tomado en la muestra. Al final de este proceso, se generó un archivo XLS (Excel; Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) con las variables a evaluar.

Las variables evaluadas en cada grupo fueron el biovolumen total ($\mu\text{m}^3 / \text{Log}_{10}$) y el porcentaje de células verdes (células viables), que fue calculado de la siguiente manera: población verde / (población verde + población roja).

³²³ Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:1734–9.

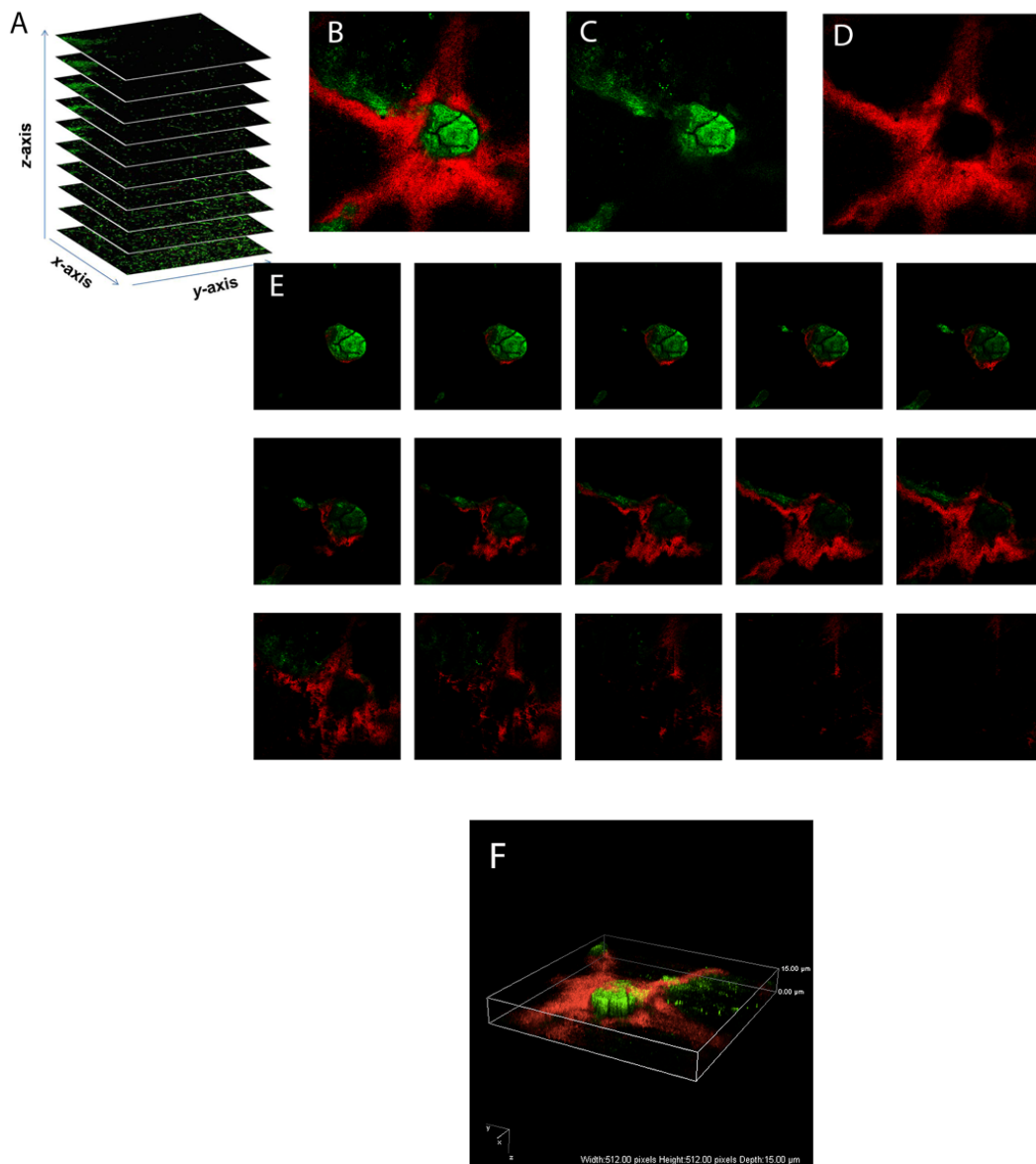


Figura 3.6. Proyección plana y tridimensional correspondiente a una sección de una biopelícula tratada con ALX durante 3 minutos. **A)** Imagen tomada de http://www.bioimager.com/Luis_chavez_de_paz³²⁴, que revela como una proyección máxima tomada en el MLC, está formada por imágenes planas que se apilan en un mismo plano *x* e *y*, pero variando en altura a lo largo del plano *z*. **B)** Proyección máxima u *overlay* de la sección de la muestra escaneada dada por el conjunto de planos apilados. **C)** Corresponde al canal verde de la proyección máxima **D)** Canal rojo. **E)** Muestra la serie de planos en *z* en distinta altura sin apilar, con éstos se pueden construir imágenes en 3D como muestra la figura **F)**.

³²⁴ Chávez de Paz LE. Página web: http://www.bioimager.com/Luis_chavez_de_paz. Acceso el 30 de mayo de 2017.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS, versión 20.0. A todas las variables se les realizó un test ANOVA y una *post hoc* descriptiva de la prueba de Duncan para determinar agrupaciones significativas entre los grupos. La variable porcentaje de población verde fue sometida previamente a la transformación de Anscombe, para normalizar los datos ya que eran expresados en porcentaje. Una vez comprobada que todas las variables seguían una distribución normal, se utilizaron test paramétricos para comparar los datos entre todas las variables. El nivel de significancia fue, como de costumbre, $\alpha = 0.05$.

Resultados

Los resultados se han sistematizado en 3 apartados. Los dos primeros recogen la validación de la metodología empleada para la infección del sustrato dentinario y formación de las biopelículas, en cuanto a viabilidad celular y carácter polimicrobiano. En el tercer apartado se recogen los resultados de la actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras evaluadas sobre biopelículas polimicrobianas primero de forma individual y descriptiva, y seguidamente la comparación entre los distintos grupos de estudio.

4.1. VALIDACIÓN DE LA MUESTRA MICROBIOLÓGICA PARA LA INFECCIÓN DENTINARIA

La **Figura 4.1.** muestra los resultados del análisis de la viabilidad celular presente en el inóculo microbiano obtenido mediante citometría de flujo en forma de gráficos de puntos (*dop-plot* o *contour-plot*) bidimensionales. Este citograma muestra la presencia de las bacterias teñidas con SYTO-9 en el eje horizontal y en el eje vertical se representa la intensidad de fluorescencia con yoduro de propidio (IP), diferenciándose diferentes poblaciones. La población 4 (P4) es la población total presente en la muestra. La población 1 (P1) muestra las bacterias en estado viable, representado con el color verde; la población 2 (P2) refleja la presencia de microbios muertos, en el área teñida de rojo; la población 3 (P3) corresponde a bacterias que están empezando a morir, con la membrana celular ya dañada, y corresponde al área teñida de azul. La población negra son los restos presentes en las muestras.

Los resultados de este análisis mostraron una alta viabilidad celular en el inóculo, con un 76% aproximadamente de eventos vivos, lo que permitió el crecimiento y maduración de las biopelículas en la dentina.

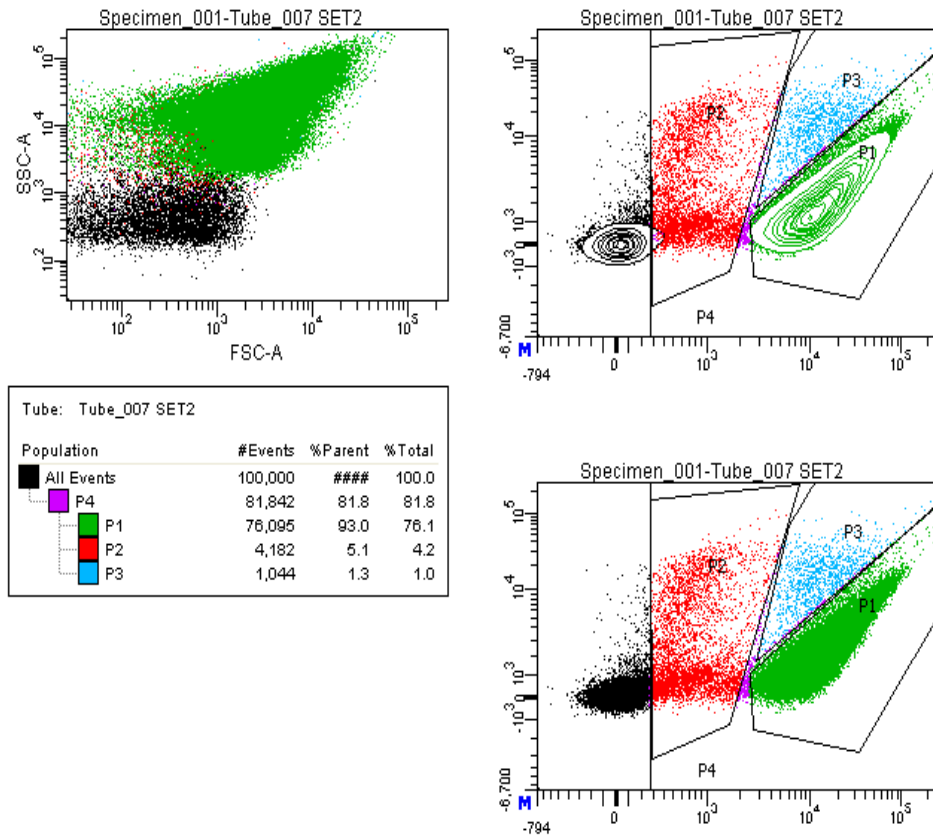


Figura 4.1. Viabilidad celular obtenida mediante citometría de flujo en el inóculo procedente de las muestras microbiológicas obtenidas clínicamente de conductos radiculares infectados. En el citograma, el área en verde muestra la población viable; el área marcada en rojo representa microbios muertos; el área celeste representa la población bacteriana que está en un proceso de apoptosis temprana; el área negra viene representada por los debris.

4.2. VALIDACIÓN Y CONTROL DE LA VIABILIDAD Y CARÁCTER POLIMICROBIANO DE LAS BIOPELÍCULAS FORMADAS EN DENTINA.

4.2.1. VALIDACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LAS BIOPELÍCULAS

Para conocer el marco temporal de desarrollo y viabilidad de las biopelículas a lo largo de su formación, se establecieron dos tiempos de estudio, uno preliminar, a la semana de incubación, – en el que se considera la biopelícula aún inmadura- y otro definitivo, a las tres semanas de incubación –en el que se considera que la biopelícula ha alcanzado su madurez³²⁵. Para ello, dos especímenes adicionales, en cada periodo de tiempo, fueron marcados con el kit de viabilidad LIVE/DEAD®, (BacLight™; Invitrogen, Eugene, OR, USA) y 5 áreas (*z-stack*) al azar, en cada muestra y periodo de tiempo, fueron escaneadas mediante MLC. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el *software* *biolmage_L*³²⁶ que permitió obtener el porcentaje de bacterias viables (**Tabla 4.1.**). Este análisis reveló un alto porcentaje de viabilidad microbiana a la semana de formación de las biopelículas, con aproximadamente el 78,06% de células vivas (población verde), porcentaje que aumentó al 86% conforme las biopelículas se consideraron ya maduras (3 semanas) (**Gráfico 4.1.**). La **figura 4.2.** muestra imágenes representativas de las biopelículas formadas en estos dos periodos de control.

³²⁵ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37:657–61.

³²⁶ Chávez de Paz, L.E. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:1734–9.

Tabla 4.1. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del porcentaje de bacterias viables a 1ª y 3ª semana de formación de las biopelículas.

Control 1º semana		Control 3º semana	
Viabilidad	Células viables (%)	Viabilidad	Células viables (%)
Media	78,06	Media	86,03
Mediana	73,98	Mediana	89,58
Desviación típica	17,27	Desviación típica	11,95
Mínimo	39,37	Mínimo	98,79
Máximo	99,91	Máximo	86,03

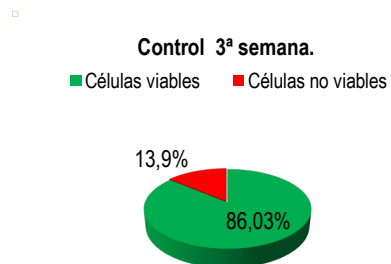
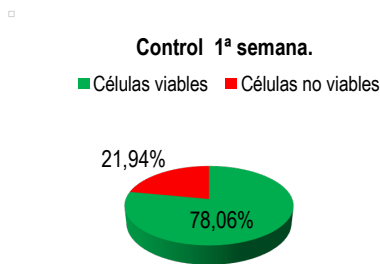


Gráfico 4.1. Representación gráfica del control de la viabilidad bacteriana a la 1ª y 3ª semana de maduración de las biopelículas.

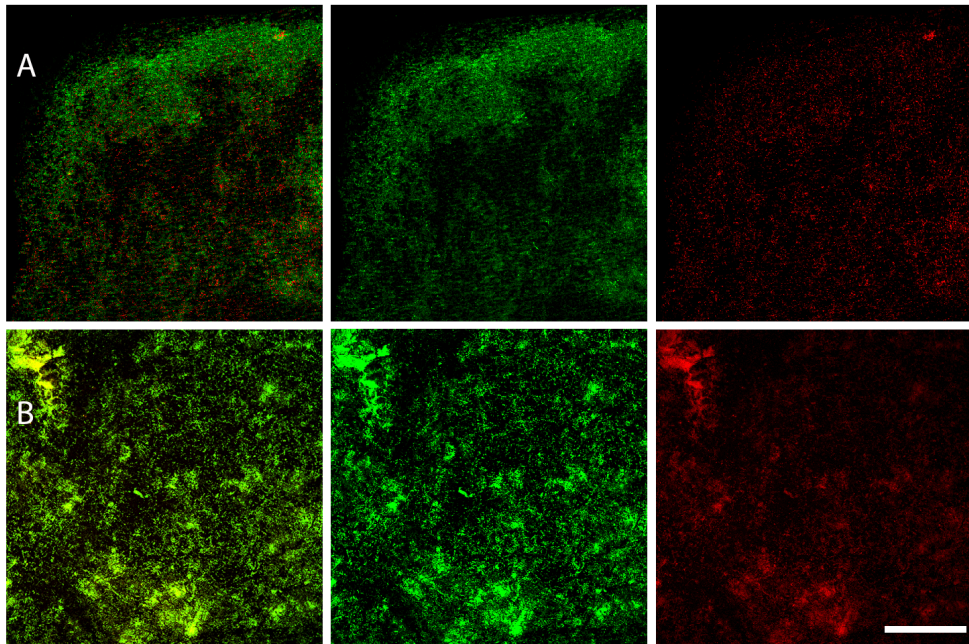


Figura 4.2. Control de la viabilidad celular obtenida en las biopelículas de una semana (A) y tres semanas (B) de maduración, mediante MLC. Visto de forma horizontal, en cada fila, la primera imagen corresponde a la proyección máxima u *overlay*, la segunda al canal verde y la tercera, al canal rojo. Las células verdes representan células con la membrana intacta mientras que las rojas están dañadas o muertas. La barra blanca representa una escala de 100 micras.

4.2.2. VALIDACIÓN DEL CARÁCTER POLIMICROBIANO DE LAS BIOPELÍCULAS

Las imágenes obtenidas mediante M.E.B. confirmaron la formación y el carácter polimicrobiano de las biopelículas formadas en dentina. Como puede observarse en la **Figura 4.3.**, tras tres semanas de incubación, se confirmó la presencia de un *biofilm* heterogéneo multiespecies formado por cocos, bacilos y especies filamentosas inmersas en una matriz de polisacáridos, organizadas en forma de las estructuras típicas de las biopelículas naturales.

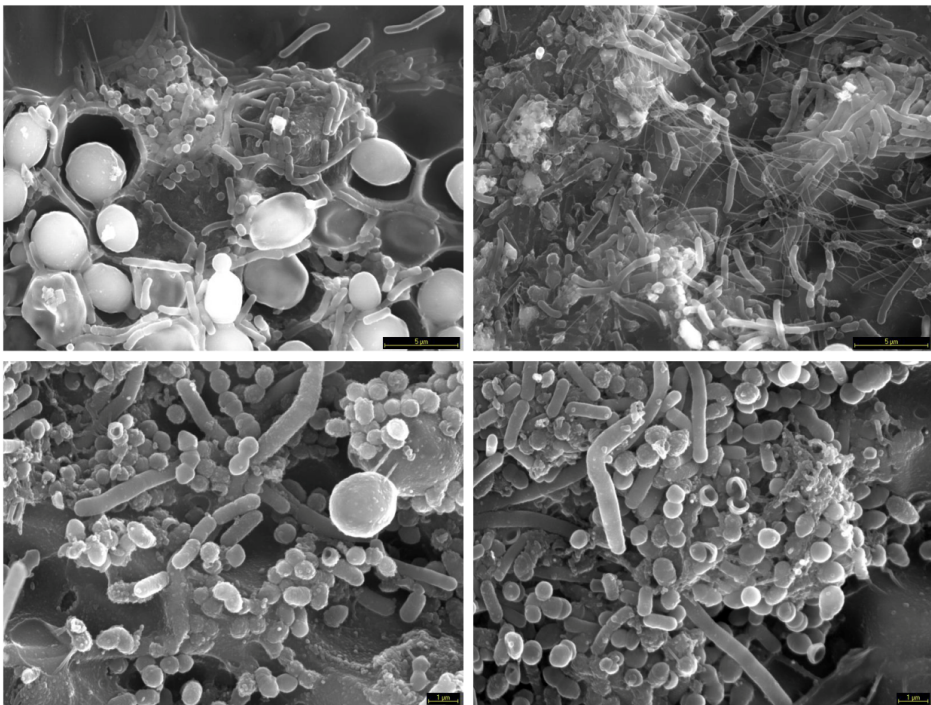


Figura 4.3. Microfotografías del M.E.B a 1500 y 4000 aumentos de la biopelículas polimicrobianas formadas. La barra representa 5 y 1 micras.

4.3. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES IRRIGADORAS SOBRE BIOPELÍCULAS POLIMICROBIANAS

Un total de 6 soluciones irrigadoras y un grupo control fueron testadas sobre biopelículas polimicrobianas maduras (3 semanas de incubación) formadas sobre UVDs (n=4/grupo). De cada espécimen fueron escaneadas 5 áreas al azar (*z-stack*) mediante MLC. Por tanto un total de 20 áreas (3D *stacks*)/grupo), 140 en total, fueron analizadas con el *software* *bioImage_L*, lo que permitió obtener imágenes en 2D y 3D de las biopelículas formadas y calcular el biovolumen total y el porcentaje de microorganismos viables y no viables.

Para exponer la eficacia antimicrobiana de las soluciones irrigadoras y sus combinaciones frente a biopelículas polimicrobianas, se describirán en primer lugar los resultados de la actividad antimicrobiana *per se*, obtenidos con las diferentes soluciones irrigadoras testadas. A continuación se muestra la comparativa entre todos los grupos en relación con el control. En ambos casos, los resultados se van a expresar de dos formas: en biovolumen total (μm^3 y en escala logarítmica) y como porcentaje de células verdes (microbios viables).

4.3.1. GRUPO CONTROL (AGUA DESTILADA)

La **Tabla 4.2.** muestra los resultados (media, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo) del análisis de las áreas escaneadas en el grupo tratado con agua destilada, en términos de biovolumen total (μm^3) y porcentaje de células vivas. Tras tres minutos de contacto con agua destilada, las biopelículas mostraron un 86% de viabilidad microbiana (**Gráfico 4.2.**) y un Log_{10} biovolumen total de 4,02 μm^3 . Imágenes representativas de este grupo se muestran en la **Figura 4.4.**

Tabla 4.2. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del biovolumen total (μm^3), Log_{10} del biovolumen total (μm^3) y porcentaje de células viables (%). Grupo tratado con agua destilada.

Grupo control agua destilada	Biovolumen total (μm^3)	Log_{10} Biovolumen total (μm^3)	Células viables (%)
Media	$1,47 \times 10^4$	4,02	86,03
Mediana	$1,43 \times 10^4$	4,16	89,58
Desviación típica	$8,42 \times 10^3$	0,24	11,95
Mínimo	$3,73 \times 10^4$	4,15	98,79
Máximo	$1,47 \times 10^4$	4,02	86,03

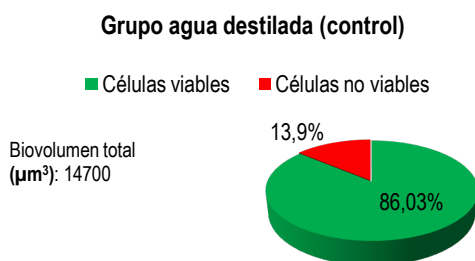


Gráfico 4.2. Representación gráfica de la viabilidad bacteriana en el grupo agua destilada.

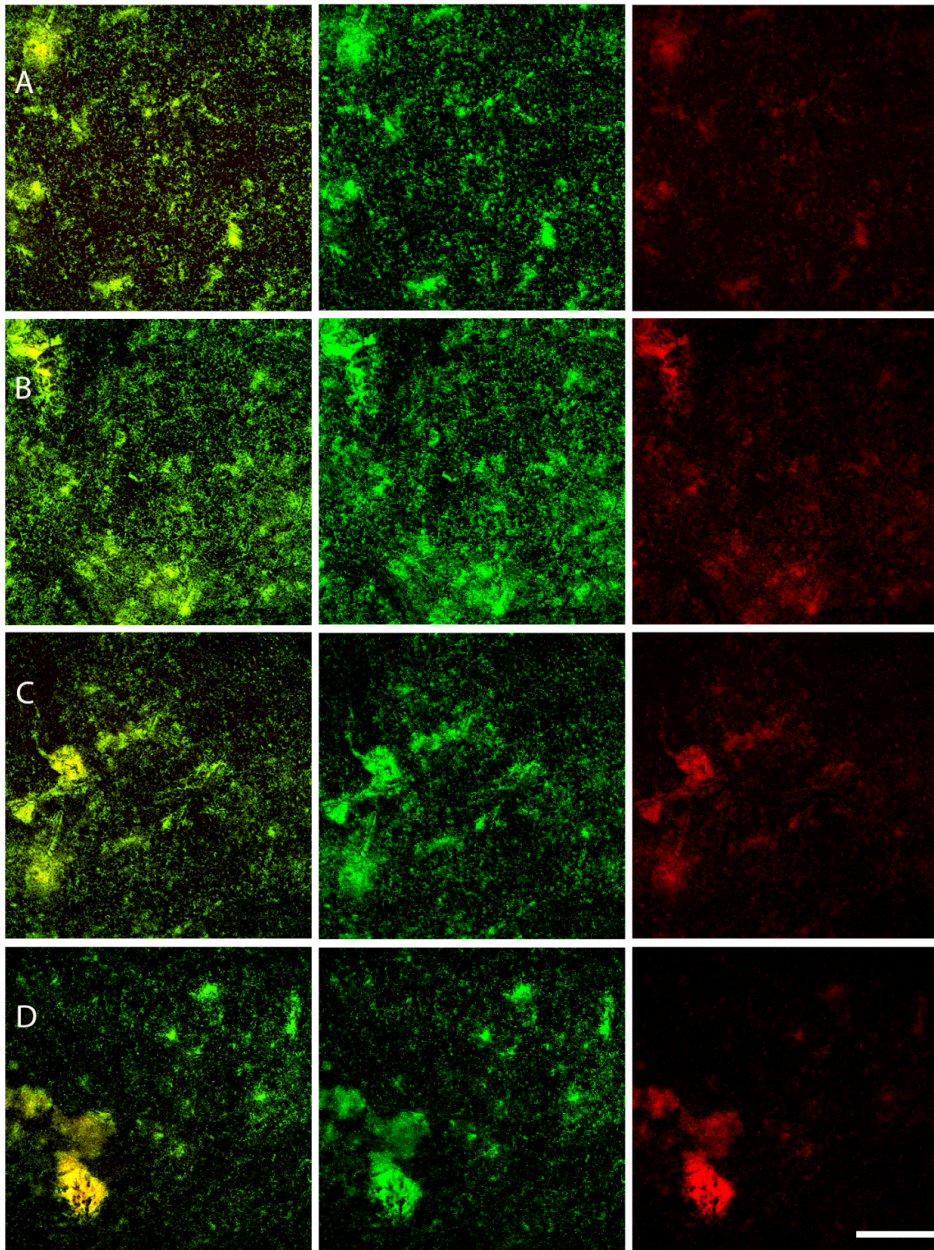


Figura 4.4. Reconstrucción tridimensional de las áreas escaneadas con MLC de biopelículas polimicrobianas tratadas con agua destilada estéril durante 3 minutos. A) Series de Proyección máxima u *overlay*, B) proyección del canal verde (células viables) y C) proyección del canal rojo (células no viables). Cada fila corresponde a una representación de un espécimen del grupo. La barra blanca representa 100 micras.

4.3.2. GRUPO HIPOCLORITO SÓDICO AL 2,5%

El grupo tratado con NaClO al 2,5% mostró los valores más bajos en todos los parámetros evaluados, de todos los grupos (**Tabla 4.3. y Gráfico 4.3**). El biovolumen total se redujo a la mitad con respecto al grupo control y sólo el 4,26% de los microorganismos de las biopelículas fueron viables tras tres minutos de contacto con NaClO al 2,5%. Imágenes representativas se muestran en la **Figura 4.5**.

Tabla 4.3. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del biovolumen total (μm^3), Log_{10} del biovolumen total (μm^3) y porcentaje de células viables (%). Grupo tratado con NaClO al 2,5%.

Grupo NaClO 2,5%	Biovolumen total (μm^3)	Log_{10} Biovolumen total (μm^3)	Células viables (%)
Media	$3,15 \times 10^2$	2,14	4,26
Mediana	$1,24 \times 10^3$	2,09	1,8
Desviación típica	$5,83 \times 10^2$	0,54	7,18
Mínimo	$2,2 \times 10$	1,89	0,90
Máximo	$2,69 \times 10^3$	2,40	7,62

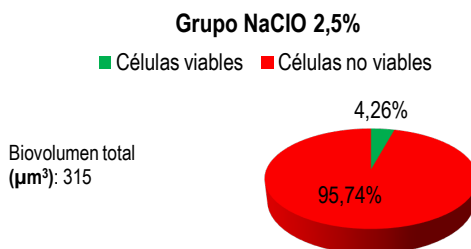


Gráfico 4.3. Representación gráfica de la viabilidad bacteriana en el grupo NaClO 2,5%.

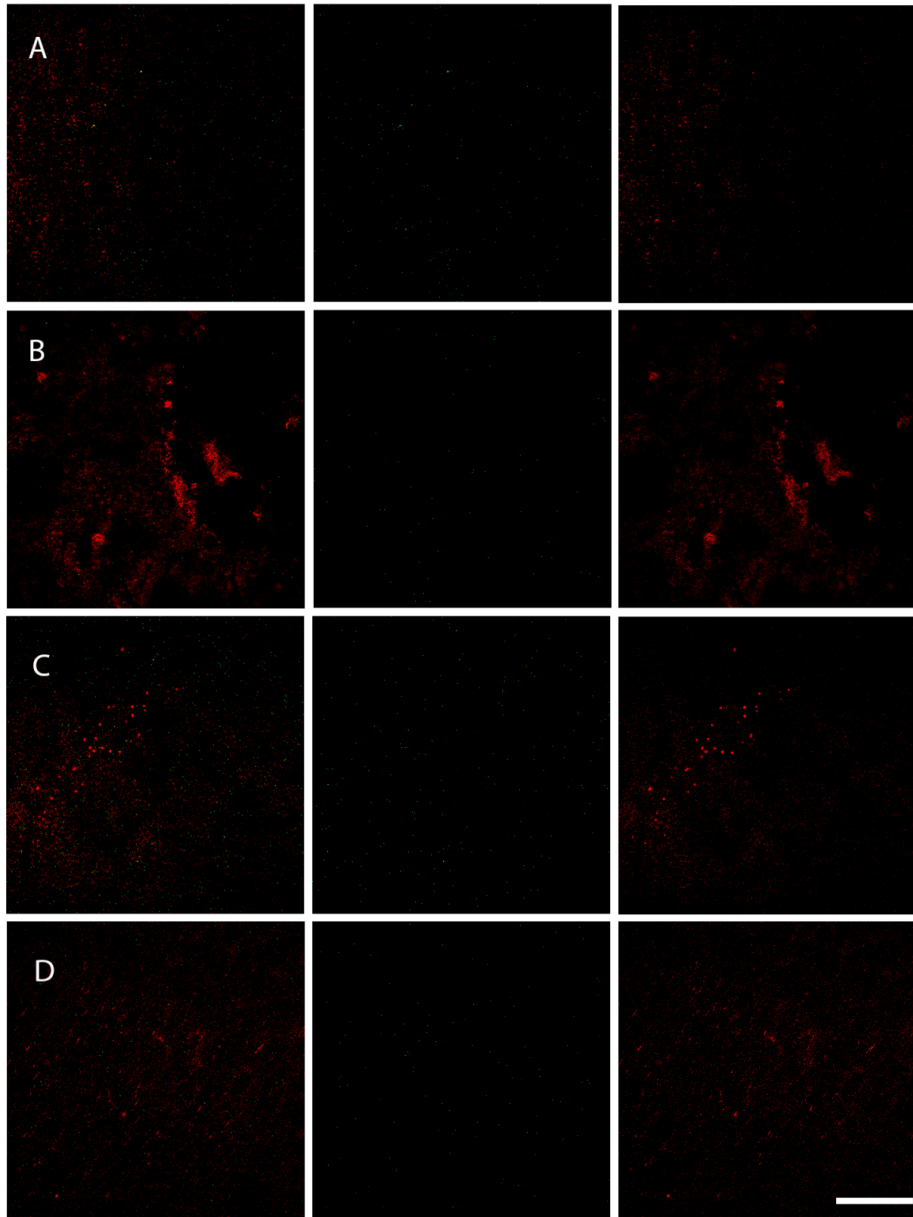


Figura 4.5. Reconstrucción tridimensional de las áreas escaneadas con MLC de biopelículas polimicrobianas tratadas con NaClO 2,5%, 3 minutos. A) Series de Proyección máxima u *overlay*, B) proyección del canal verde (células viables) y C) proyección del canal rojo (células no viables). Cada fila corresponde a una representación de un espécimen. La barra blanca representa 100 micras.

4.3.3. GRUPO CLORHEXIDINA AL 2%

El grupo tratado con CLX al 2% durante tres minutos, obtuvo un porcentaje de muerte microbiana dentro de las biopelículas del 37% mostrando unos valores de Log_{10} de biovolumen residual de casi $4 \mu\text{m}^3$, valor similar al obtenido en el grupo control ($p < 0,05$). (Tabla 4.4, Gráfico 4.4. y Figura 4.6.).

Tabla 4.4. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del biovolumen total (μm^3), Log_{10} del biovolumen total (μm^3) y porcentaje de células viables (%). Grupo tratado con CLX al 2%.

Grupo CLX 2%	Biovolumen total (μm^3)	Log_{10} Biovolumen total (μm^3)	Células viables (%)
Media	$1,22 \times 10^4$	3,99	62,92
Mediana	$8,07 \times 10^3$	3,90	62,70
Desviación típica	$8,82 \times 10^3$	0,29	20,95
Mínimo	$3,27 \times 10^3$	3,86	16,99
Máximo	$3,45 \times 10^4$	4,12	98,45

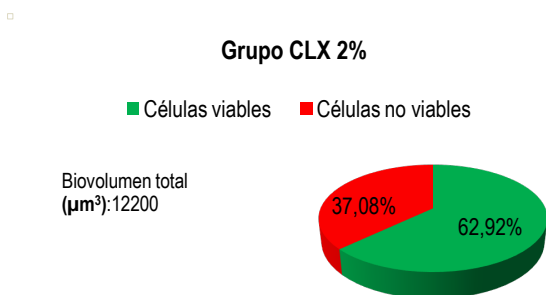


Gráfico 4.4. Representación gráfica de la viabilidad bacteriana en el grupo CLX al 2%.

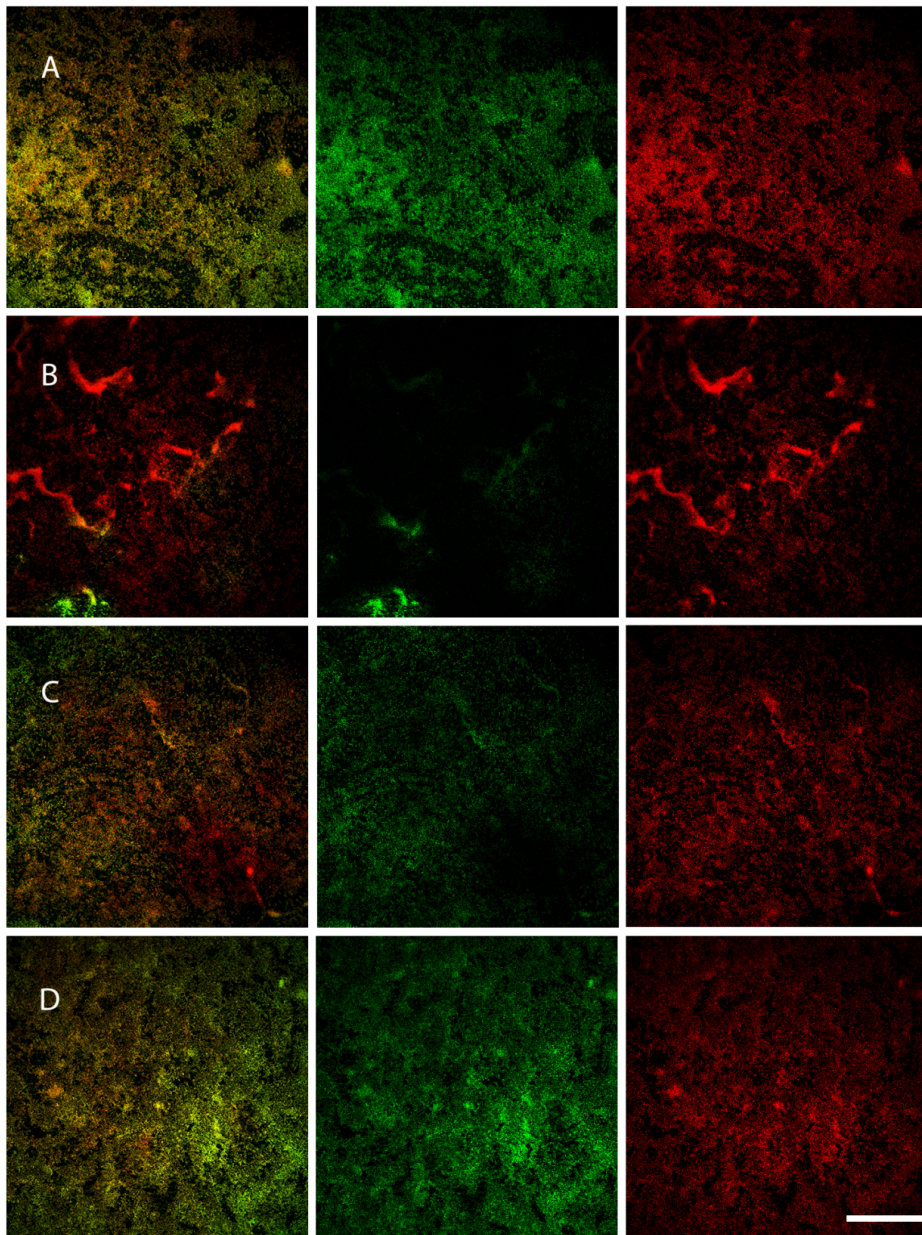


Figura 4.6. Reconstrucción tridimensional de las áreas escaneadas con MLC de biopelículas polimicrobianas tratadas con CLX 2% durante 3 minutos. A) Series de Proyección máxima u *overlay*, B) proyección del canal verde (células viables) y C) proyección del canal rojo (células no viables). Cada fila corresponde a una representación de un espécimen. La barra blanca representa 100 micras.

4.3.4. GRUPO CETRIMIDA AL 0,2%

Cetrimida al 0,2% obtuvo valores de Log_{10} Biovolumen total comparables a los del grupo control aunque con diferencias significativas ($p > 0,05$) (**Tabla 4.5**). Sin embargo, el porcentaje de viabilidad microbiana fue la mitad con respecto al grupo tratado con agua destilada (**Gráfico 4.5. y Figura 4.7.**).

Tabla 4.5. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del biovolumen total (μm^3), Log_{10} del biovolumen total (μm^3) y porcentaje de células viables (%). Grupo tratado con CTR al 0,2%.

Grupo CTR 0, 2%	Biovolumen total (μm^3)	Log_{10} Biovolumen total (μm^3)	Células viables (%)
Media	$8,84 \times 10^4$	4,39	45,83
Mediana	$1,58 \times 10^4$	4,19	34,01
Desviación típica	$1,44 \times 10^5$	0,70	28,69
Mínimo	$2,33 \times 10^3$	4,04	9,62
Máximo	$4,17 \times 10^5$	4,73	86,81

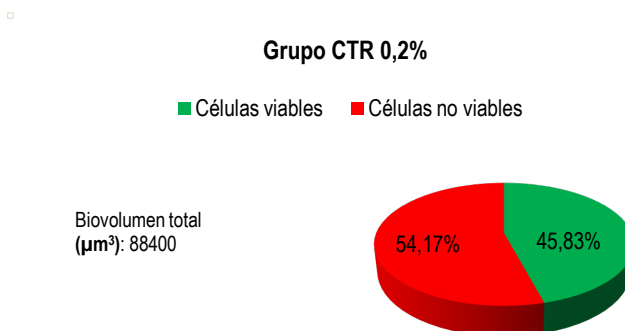


Gráfico 4.5. Representación gráfica de la viabilidad bacteriana en el grupo CTR 0,2%.

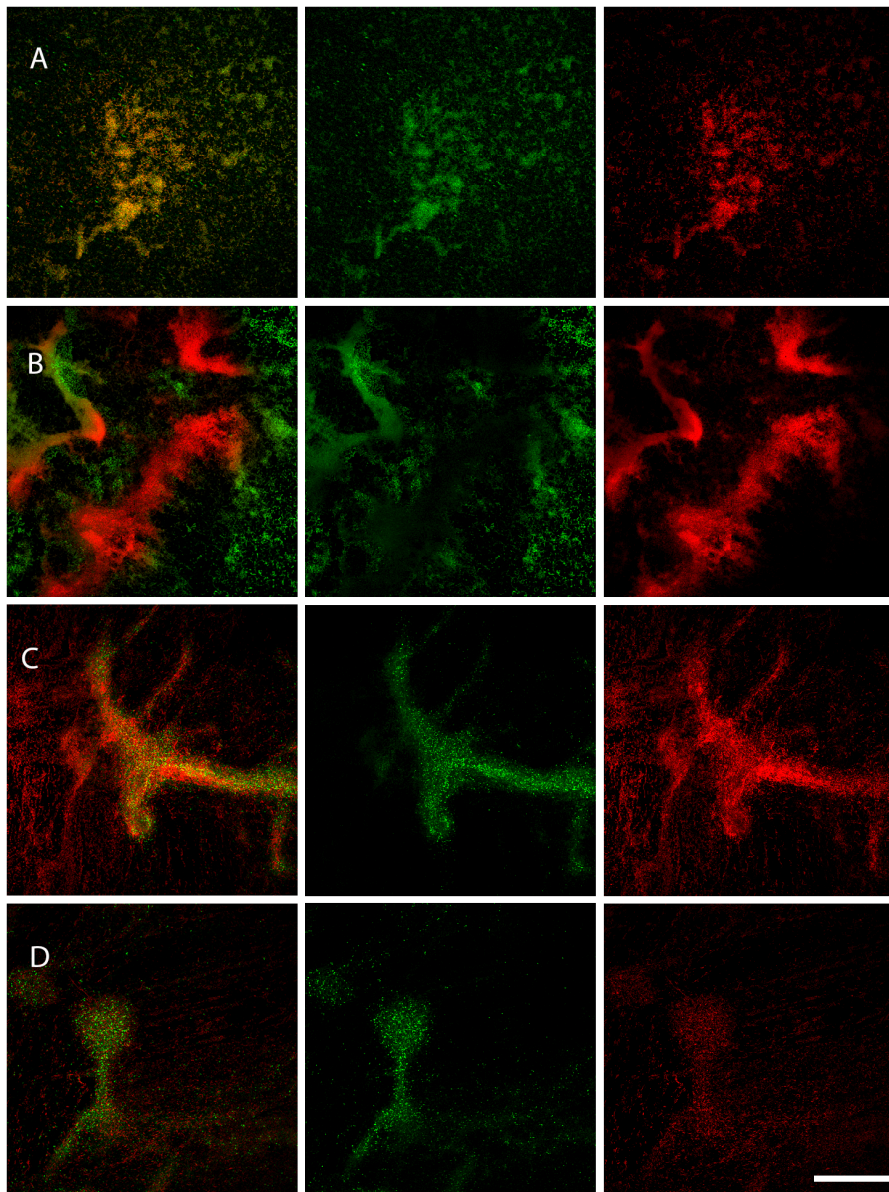


Figura 4.7. Reconstrucción tridimensional de las áreas escaneadas con MLC de biopelículas polimicrobianas tratadas con CTR 0,2% durante 3 minutos. A) Series de Proyección máxima u *overlay*, B) proyección del canal verde (células viables) y C) proyección del canal rojo (células no viables). Cada fila corresponde a una representación de un espécimen. La barra blanca representa 100 micras.

4.3.5. GRUPO ALEXIDINA AL 2%

Alexidina al 2% mostró un porcentaje de viabilidad bacteriana del 44,09%, la mitad con respecto al grupo control tratado con agua destilada, y menor que el grupo tratado con CLX 2% (**Tabla 4.6**). (**Gráfico 4.6. y Figura 4.8.**). Los valores de biovolumen total fueron similares a los obtenidos en el grupo control, aunque con diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabla 4.6. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del biovolumen total (μm^3), Log_{10} del biovolumen total (μm^3) y porcentaje de células viables (%). Grupo tratado con ALX al 2%.

Grupo ALX 2%	Biovolumen total (μm^3)	Log_{10} Biovolumen total (μm^3)	Células viables (%)
Media	$1,02 \times 10^5$	4,87	44,09
Mediana	$9,59 \times 10^4$	4,98	45,54
Desviación típica	$7,64 \times 10^4$	0,37	17,71
Mínimo	$1,68 \times 10^4$	4,70	14,65
Máximo	4.17×10^5	4.73	86.81

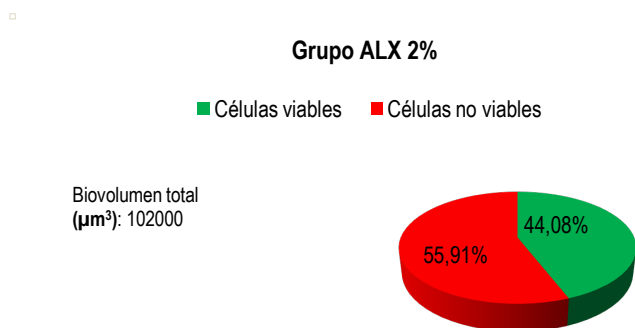


Gráfico 4.6. Representación gráfica de la viabilidad bacteriana en el grupo ALX 2%.

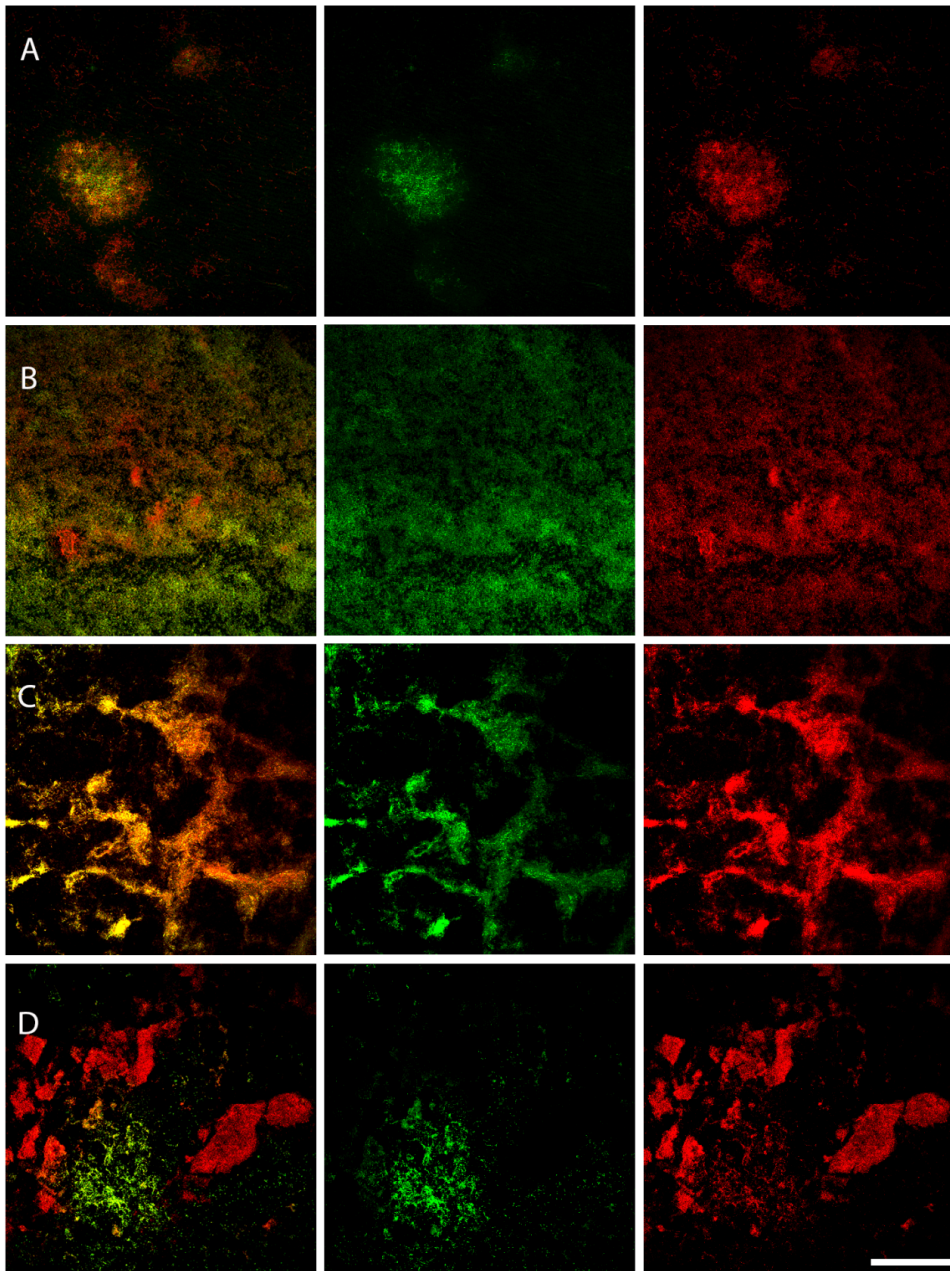


Figura 4.8. Reconstrucción tridimensional de las áreas escaneadas con MLC de biopelículas polimicrobianas tratadas con ALX 2% durante 3 minutos. A) Series de Proyección máxima u *overlay*, B) proyección del canal verde (células viables) y C) proyección del canal rojo (células no viables). Cada fila corresponde a una representación de un espécimen. La barra blanca representa 100 micras.

4.3.6. GRUPO CLORHEXIDINA AL 2% + CETRIMIDA AL 0, 2%

La adición de CTR al 0,2% a CLX 2% mejoró sustancialmente los valores obtenidos de muerte microbiana (71,37%) que con CLX 2% sola (37,08%), con valores de biovolumen total comparables y sin diferencias significativas con respecto al grupo control (Tabla 4.7., Gráfico 4.7. y Figura 4.9.).

Tabla 4.7. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del biovolumen total (μm^3), Log_{10} del biovolumen total (μm^3) y porcentaje de células viables (%). Grupo tratado con CLX 2%+CTR 0,2%.

Grupo CLX 2%+CTR 0,2%	Biovolumen total (μm^3)	Log_{10} Biovolumen total (μm^3)	Células viables (%)
Media	$1,75 \times 10^4$	4,16	28,63
Mediana	$1,49 \times 10^4$	4,17	26,69
Desviación típica	$9,99 \times 10^3$	0,25	23,68
Mínimo	$5,52 \times 10^3$	4,04	0,22
Máximo	$4,43 \times 10^4$	4,28	81,54

□

Grupo CLX 2% + CTR 0,2%

■ Células viables ■ Células no viables

Biovolumen total (μm^3): 17500

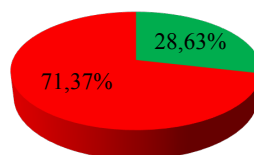


Gráfico 4.7. Representación gráfica de la viabilidad bacteriana en el grupo CLX 2% + CTR 0,2%.

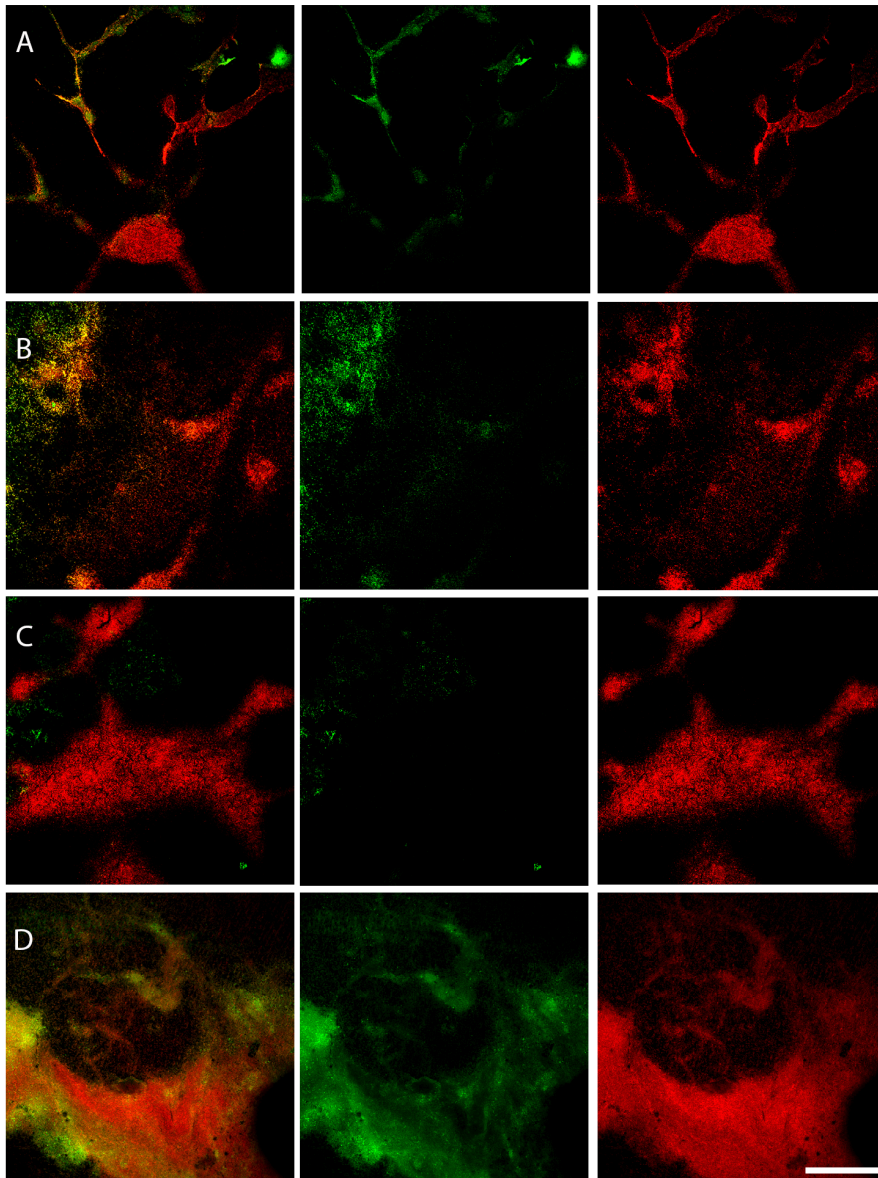


Figura 4.9. Reconstrucción tridimensional de las áreas escaneadas con MLC de biopelículas polimicrobianas tratadas con CLX 2%+CTR 0,2% durante 3 minutos. Series de Proyección máxima u *overlay*, seguida de la proyección del canal verde (células viables) y la proyección del canal rojo (células no viables). Cada letra corresponde a una representación de un espécimen. La barra blanca representa 100 micras.

4.3.7. GRUPO ALEXIDINA AL 2% + CETRIMIDA AL 0, 2%

el uso combinado de ALX 2%+ CTR 0,2% también redujo, aunque no tanto como CLX 2%+CTR 0,2%, la viabilidad celular en las biopelículas. De igual forma, este grupo mostró valores de Biovolumen total (μm^3) superiores al grupo tratado con agua destilada. (Tabla 4.8., Gráfico 4.8. y Figura 4.10.).

Tabla 4.7. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del biovolumen total (μm^3), Log_{10} del biovolumen total (μm^3) y porcentaje de células viables (%). Grupo tratado con ALX 2%+CTR 0,2%.

Grupo ALX 2%+CTR 0,2%	Biovolumen total (μm^3)	Log_{10} Biovolumen total (μm^3)	Células viables (%)
Media	$1,46 \times 10^5$	5,13	33,39
Mediana	$1,33 \times 10^5$	5,12	33,44
Desviación típica	$5,41 \times 10^4$	0,16	15,90
Mínimo	$7,58 \times 10^4$	5,06	11,70
Máximo	$2,41 \times 10^5$	5,21	71,71

□

Grupo ALX 2% + CTR 0,2%

■ Células viables ■ Células no viables

Biovolumen total (μm^3): 146000

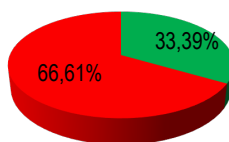


Gráfico 4.8. Representación gráfica de la viabilidad bacteriana en el grupo ALX 2% + CTR 0,2%.

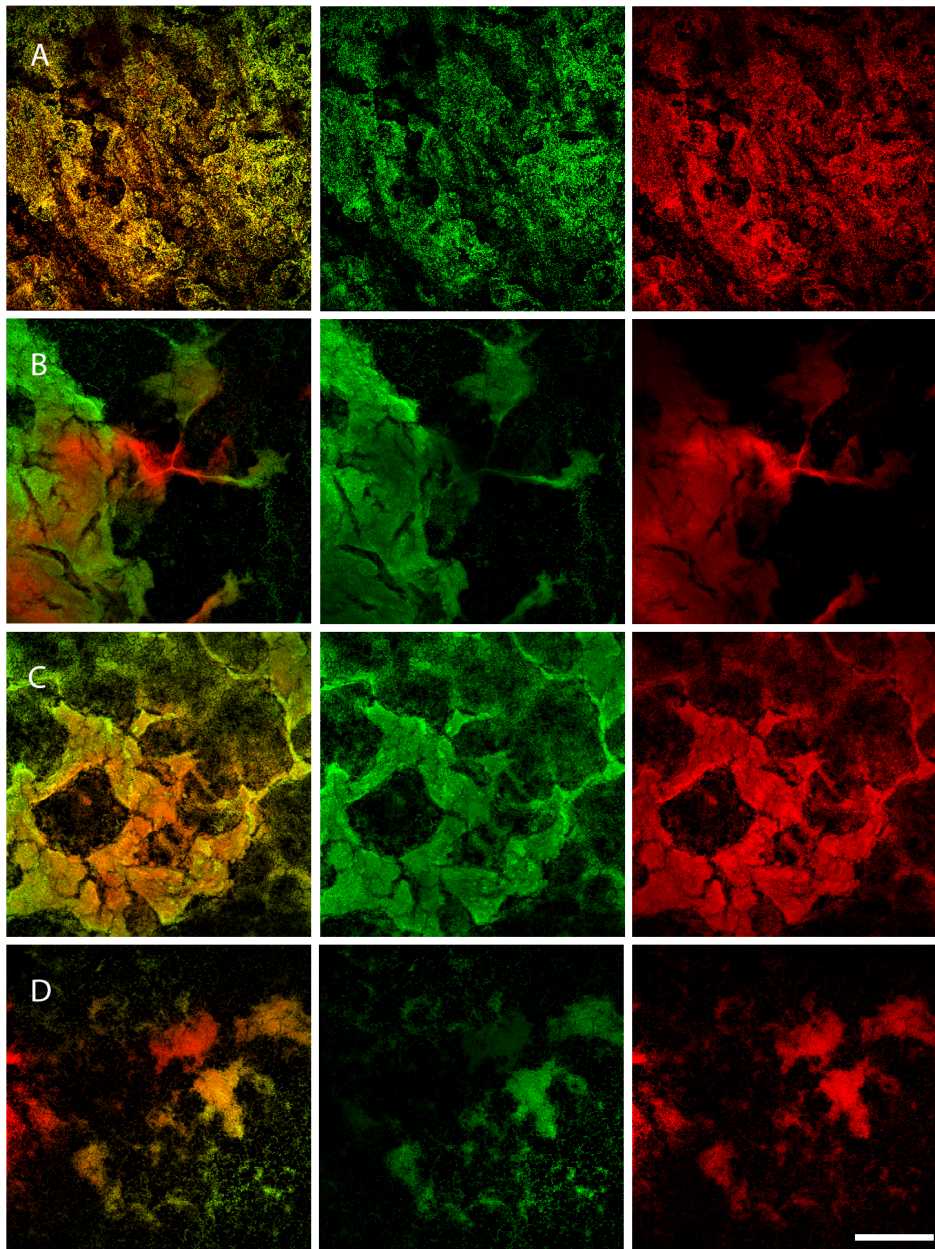


Figura 4.10. Reconstrucción tridimensional de las áreas escaneadas con MLC de biopelículas polimicrobianas tratadas con CLX 2% + CTR 0,2% durante 3 minutos. Series de Proyección máxima u *overlay*, seguida de la proyección del canal verde (células viables) y de la proyección del canal rojo (células no viables). Cada letra corresponde a una representación de un espécimen. La barra blanca representa 100 micras.

4.3.8. COMPARACIÓN GLOBAL ENTRE GRUPOS

BIOVOLUMEN TOTAL

La comparativa global entre grupos, mostró diferencias significativas entre las distintas soluciones irrigadoras evaluadas sobre las biopelículas polimicrobianas. Los valores de biovolumen residual obtenidos en el grupo de NaClO al 2,5% fueron los más bajos obtenidos de entre todas las soluciones testadas. No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al biovolumen total entre el grupo de agua destilada y CLX al 2%. La adición de CTR al 0,2% a CLX y ALX no mejoró los valores de biovolumen residual total obtenidos.

Tabla 4.9. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del Log₁₀ del biovolumen total (μm³) tras 3 min de contacto con las soluciones antimicrobianas frente a biopelículas polimicrobianas.

	Log ₁₀ biovolumen total (μm ³)						
	Agua destilada ^a	NaClO 2.5% ^b	CLX 2% ^a	CTR 0,2% ^c	ALX 2% ^d	ALX 2% + CTR0,2% ^e	CLX2% + CTR0,2% ^{a,c}
Media (DE)	4,02 (0,24)	2,14 (0,54)	3,99 (0,30)	4,39 (0,70)	4,87 (0,37)	5,13 (0,16)	4,16 (0,25)
Mediana	4,16	2,09	3,90	4,19	4,98	5,12	4,17
Mínimo	3,89	1,89	3,86	4,04	4,70	5,06	4,04
Máximo	4,15	2,40	4,12	4,73	5,03	5,21	4,28

Comparación global entre grupos determinada por el test ANOVA ($p < 0.001$). Las mismas letras en superíndice muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas determinadas por el test de Duncan ($p < 0.05$).

PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES

El porcentaje de células viables obtenido en el grupo NaClO al 2,5% fue significativamente menor con respecto al grupo control y el resto de grupos ($p > 0,05$), seguido del grupo tratado con ALX al 2% y CTR al 0,2%. El grupo tratado con CLX al 2% mostró un menor porcentaje de células vivas con respecto al grupo control. La adición de CTR al 0,2% incrementó el efecto antimicrobiano de CLX al 2%. No hubo diferencias significativas entre CTR al 0,2% y ALX al 2% y la combinación de ambos ($p < 0,05$). Imágenes representativas de todos los grupos se muestran en la **Figura 4.11., 4.12., 4.13 y 4.14.**

Tabla 4.10. Media (DE), mediana, mínimo y máximo del porcentaje de células viables tras 3 min de contacto con las soluciones antimicrobianas frente a biopelículas polimicrobianas.

Células viables (%)							
	Agua destilada^a	NaClO 2.5%^b	CLX 2%^c	CTR 0,2%^d	ALX 2%^d	ALX 2% + CTR0,2%^{d,e}	CLX2% + CTR0,2%^e
Media (DE)	86,03 (11,95)	4,26 (7,18)	62,92 (26,95)	45,83 (28,69)	44,09 (17,70)	33,39 (15,90)	28,63 (23,68)
Mediana	89,58	1,8	62,70	34,01	45,54	33,44	26,69
Mínimo	63,02	0,90	16,99	9,62	14,65	11,70	0,22
Máximo	98,79	7,62	98,45	86,81	79,90	71,71	81,54

Comparación global entre grupos determinada por el test ANOVA ($p < 0,001$). Las mismas letras en superíndice muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas determinadas por el test de Duncan ($p < 0,05$).

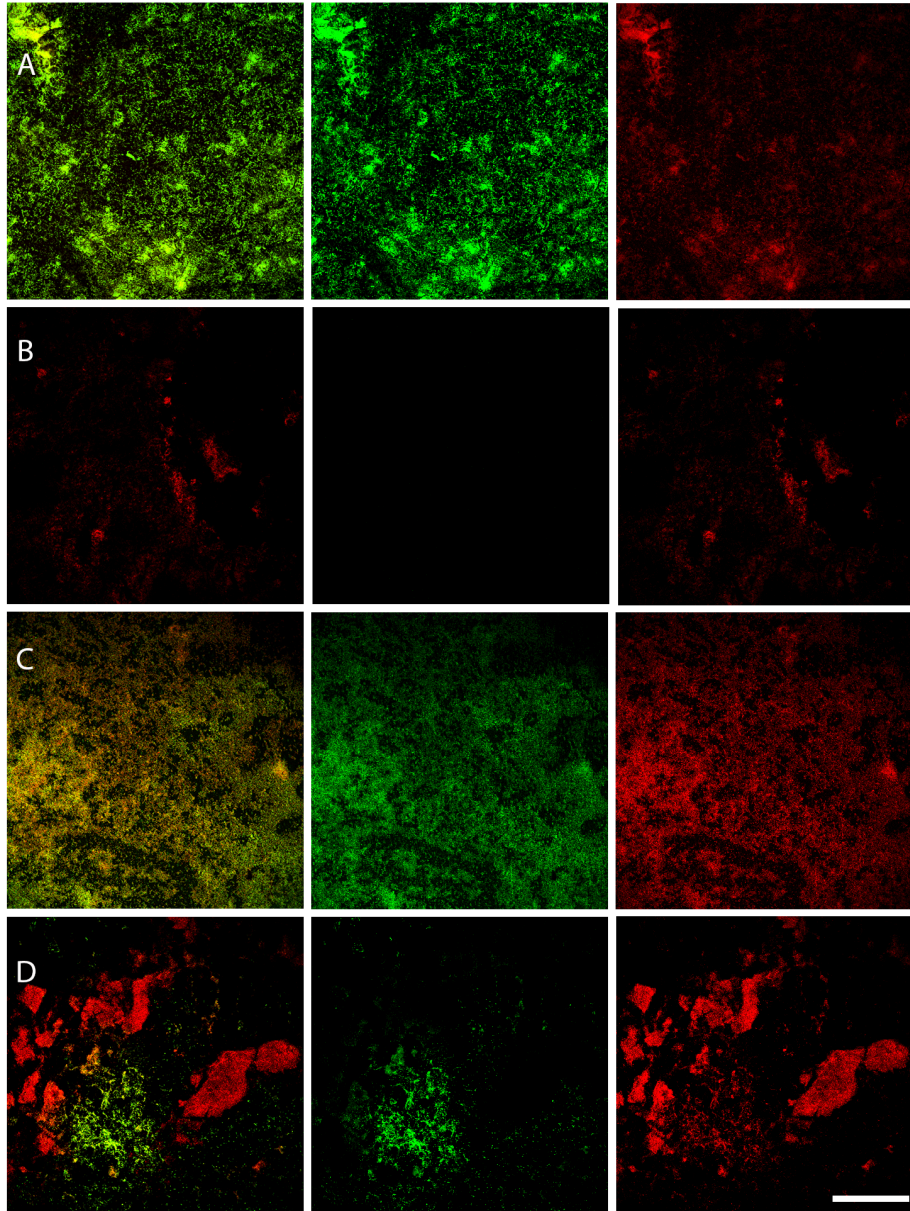


Figura 4.11. Proyecciones máximas u *overlay* seguidas de la proyección del canal verde y proyección del canal rojo de MLC representativas de biopelículas polimicrobianas incubadas durante 3 semanas y tratadas con las soluciones antimicrobianas durante 3 minutos. A) Control agua destilada estéril, B) NaClO 2,5%, C) CLX 2%, D) ALX 2%. La barra blanca representa 100 micras.

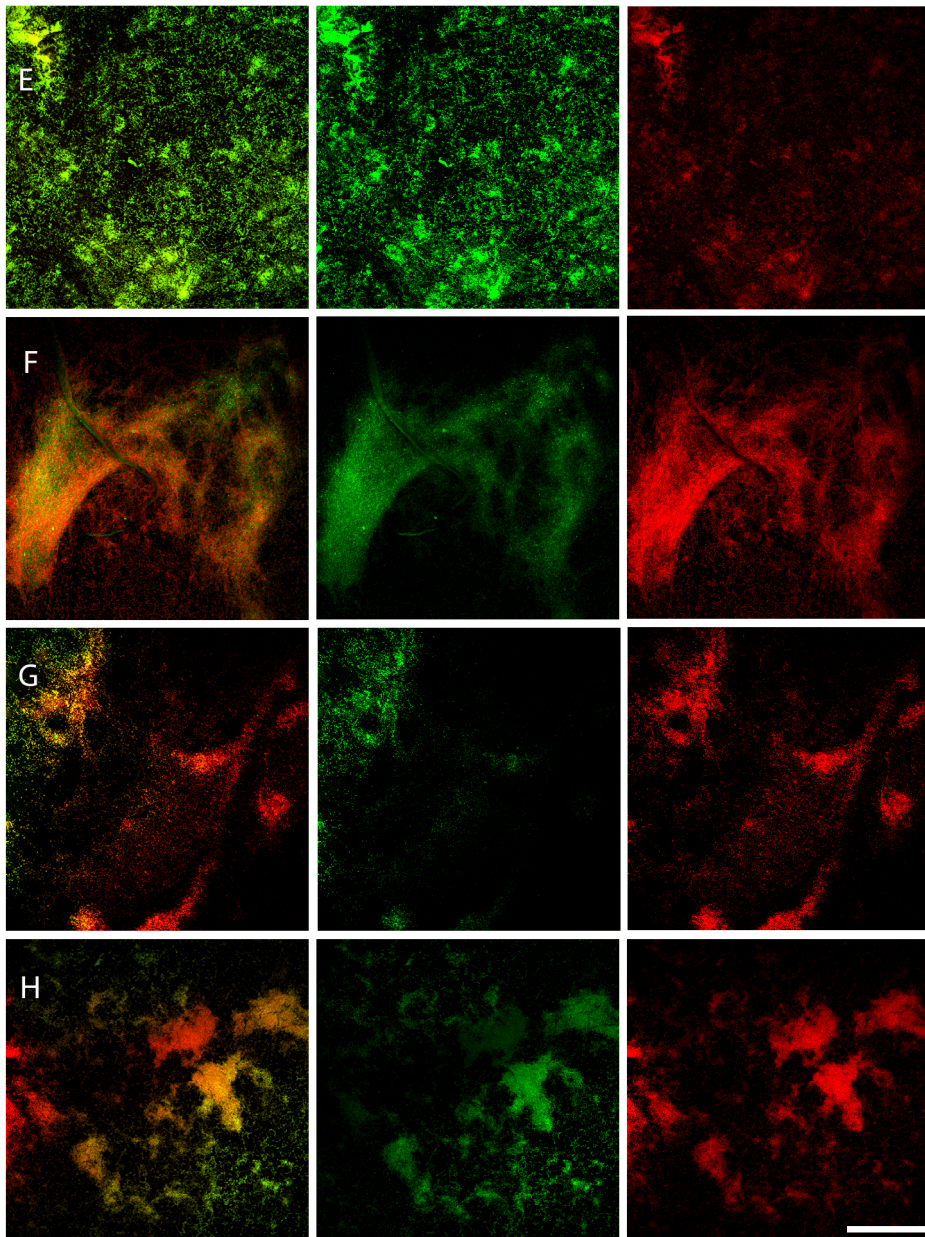


Figura 4.12. Proyecciones máximas u *overlay* seguidas de la proyección del canal verde y proyección del canal rojo de MLC representativas de biopelículas polimicrobianas incubadas durante 3 semanas y tratadas durante 3 minutos de exposición. E) Control agua destilada estéril, F) CTR 0,2%, G) CLX 2%+CTR 0,2%, H) ALX 2%+CTR 0,2%. La barra blanca representa 100 micras.

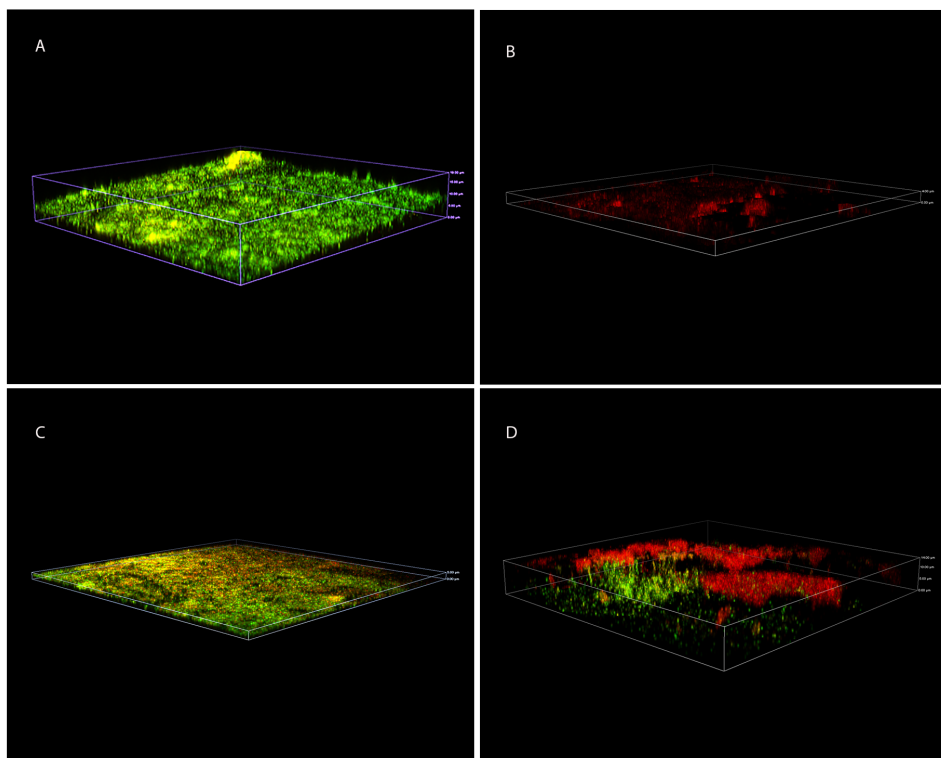


Figura 4.13. Reconstrucción tridimensional de las proyecciones confocales a partir de los Z-Stack de cada grupo. A) Control agua destilada estéril, B) NaClO 2,5%, C) CLX 2%, D) ALX 2%. La profundidad de la biopelícula viene representada por el eje z que corresponde a la arista de la figura.

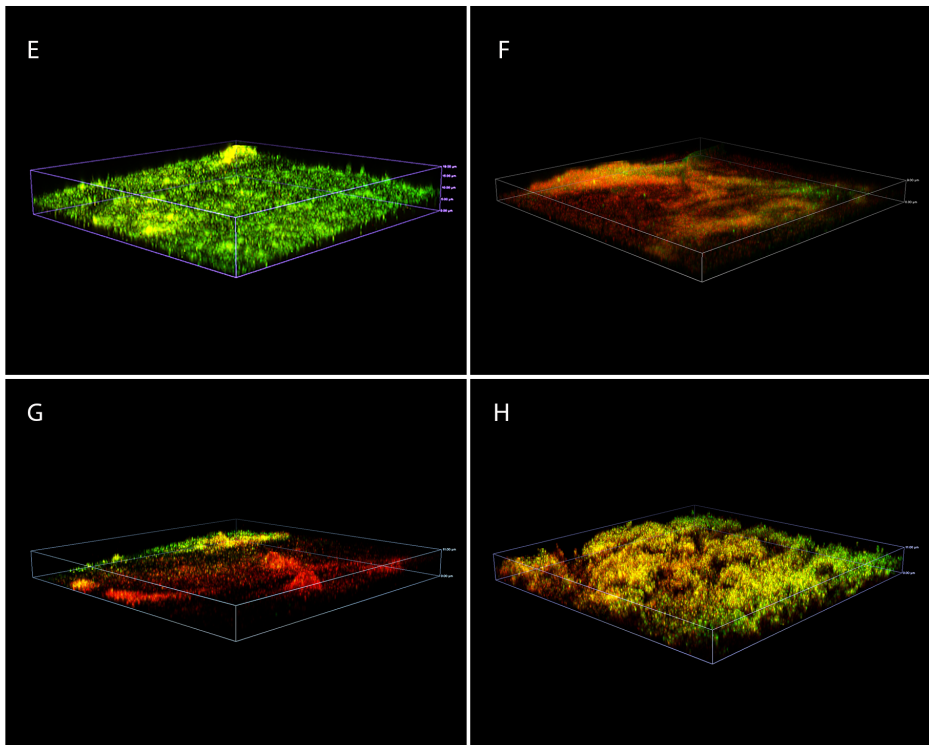


Figura 4.14. Reconstrucción tridimensional de las proyecciones confocales a partir de los *Z-Stack* de cada grupo. E) Control agua destilada estéril, F) CTR 0,2% G) CLX 2%+CTR 0,2%, H) ALX 2%+CTR 0,2%. La profundidad de la biopelícula viene representada por el eje z que corresponde a la arista de la figura.

Las imágenes obtenidas mediante M.E.B. confirmaron la actividad antimicrobiana de cada solución testada. Las imágenes representativas de cada grupo se muestran en la **Figura 4.15** y **Figura 4.16**.

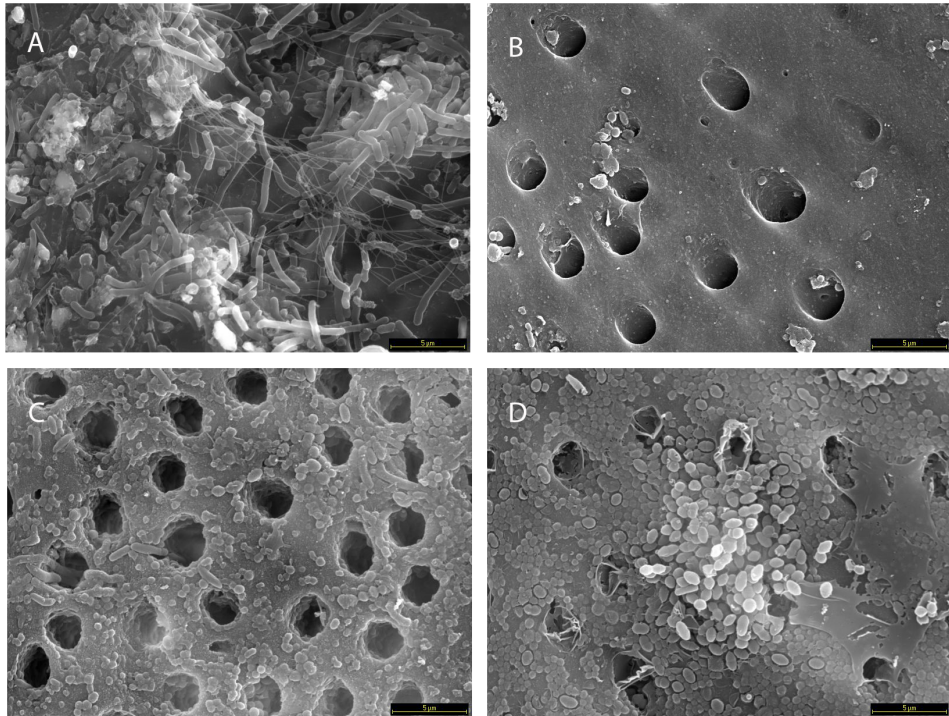


Figura 4.15. Microfotografías del M.E.B a 1500 aumentos de las biopelículas polimicrobianas con los diferentes tratamientos aplicados. A) Control agua destilada estéril, B) NaClO 2,5%, C) CLX 2%, D) ALX 2%. La barra representa 5 micras.

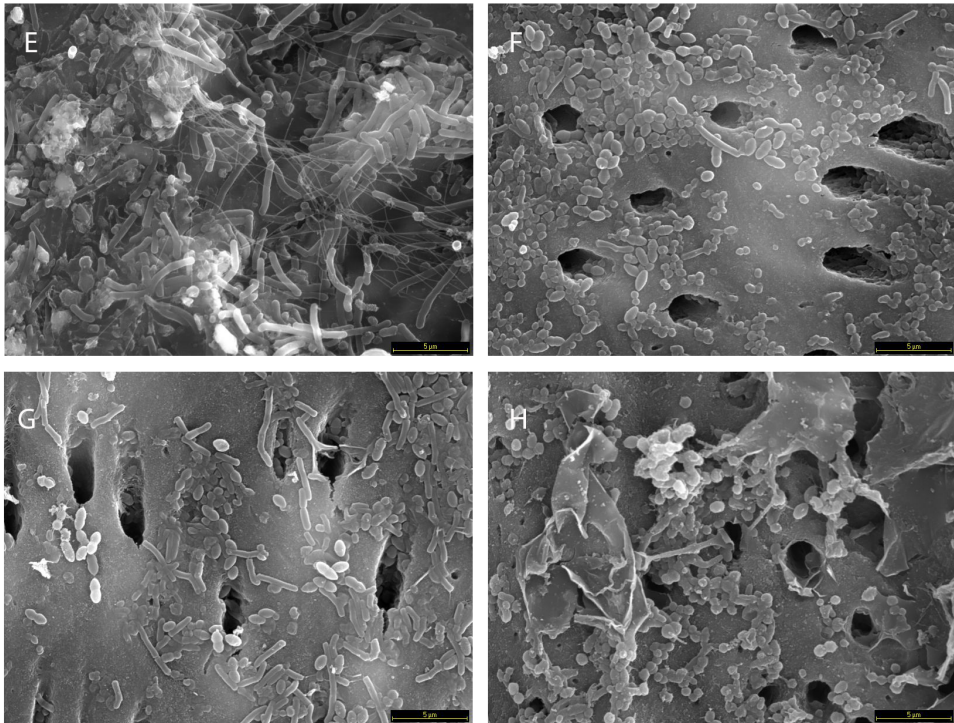


Figura 4.16. Microfotografías del M.E.B a 1500 aumentos de las biopelículas polimicrobianas con los diferentes tratamientos aplicados. E) Control agua destilada, F) CTR 0,2%, G) CLX 2%+CTR 0,2%, H) ALX 2%+CTR 0,2%. La barra representa 5 micras.

Discusión

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar la actividad antimicrobiana de distintas soluciones irrigadoras usadas en endodoncia, frente a biopelículas polimicrobianas maduras, formadas en dentina mediante microscopía láser confocal.

La discusión se organiza en dos apartados. En el primero se va a exponer la validez interna del estudio. En el segundo, se desarrollará la discusión de los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de las distintas soluciones irrigadoras evaluadas sobre biopelículas polimicrobianas maduras.

5.1. VALIDEZ INTERNA

La enfermedad endodóntica es una infección polimicrobiana, donde las bacterias se organizan en estructura de biopelículas, actuando como un organismo multicelular embebido en una matriz de polisacáridos extracelulares, que las hace más resistentes a los agentes antimicrobianos^{327,328}. El desarrollo de un *biofilm* es un proceso continuo iniciado por la adhesión de bacterias planctónicas a un sustrato o superficie pasando a través de diferentes etapas hasta que se convierte en un *biofilm* estructuralmente complejo y maduro³²⁹. Por ello, el estudio de la eficacia de las soluciones antimicrobianas *in vitro* debería realizarse sobre modelos de biopelículas que se simulen, lo más posible, la situación clínica *in vivo*, proporcionando información sobre las características del *biofilm* que finalmente conducirán a encontrar mejores estrategias para su eliminación³³⁰. Aunque, se han usado una gran variedad de modelos de infección y métodos para evaluar la efectividad de los irrigantes endodónticos, el modelo de *biofilm* no se ha estandarizado. Por ello, es difícil la comparación de los resultados de los distintos estudios o su interpolación a situaciones clínicas reales³³¹. Para este estudio, se han cultivado durante tres semanas, biopelículas polimicrobianas en dentina radicular humana, cuyo inóculo han sido muestras clínicas microbiológicas obtenidas de conductos radiculares infectados de tres pacientes diferentes, intentando simular lo más posible la dentina infectada *in vivo*.

³²⁷ Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J *et al*. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. *J Endod* 2016;42:1246-50.

³²⁸ Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-8.

³²⁹ Sauer K, Camper AK, Erhlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002;184:1140-54.

³³⁰ Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics* 2010;22:58-78.

³³¹ Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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* 2013;39:473-7.

Aunque las bacterias en la naturaleza rara vez se encuentran en la fase planctónica, la mayoría de los estudios de los desinfectantes endodónticos se han basado en bacterias en el cultivo planctónico^{332,333}. Sin embargo, se reconoce que la eficacia de los irrigantes sobre bacterias planctónicas no refleja bien el efecto del mismo sobre las bacterias que crecen en una biopelícula *in vivo*. Se ha demostrado que las bacterias del *biofilm* pueden ser de 100-1000 veces más resistentes a los agentes antibacterianos³³⁴ que sus homólogas planctónicas. Debido a esta gran diferencia, un número creciente de estudios se centran ahora en la eliminación por los agentes desinfectantes de bacterias de *biofilm* en lugar de bacterias planctónicas^{335,336,337}. Además, aunque la enfermedad endodóntica es polimicrobiana por naturaleza, causada por una comunidad multiespecies, la mayoría de los estudios *in vitro* sobre agentes antimicrobianos en endodoncia se han llevado a cabo en cultivos de una sola especie^{338,339,340,341}. En este sentido, es muy importante desarrollar *biofilms* multiespecies *in vitro*, procedentes de muestras aisladas de la infección clínica^{342,343} y no sobre biopelículas mono-especies.

Por otro lado, ciertas variables o factores cruciales como la concentración microbiana, tiempo de incubación, condiciones de crecimiento y las propiedades del sustrato donde se forma la biopelícula, pueden influir en los resultados de los modelos de *biofilm in vitro*³⁴⁴.

³³² D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999;25:351-3.

³³³ Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod* 2005;31:380-6.

³³⁴ Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771-6.

³³⁵ Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32:527-31.

³³⁶ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod* 2010; 36:1820-3.

³³⁷ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37:657-61.

³³⁸ Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 2014;40:509-14.

³³⁹ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA *et al*. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 2015;48:1188-93.

³⁴⁰ Flach N, Böttcher DE, Parolo CC, Firmino LB, Malt M, Lammers ML *et al*. Confocal microscopy evaluation of the effect of irrigants on *Enterococcus faecalis* biofilm: An *in vitro* study. *Scanning*. 2016;38:57-62

³⁴¹ Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Júnior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J* 2014;47:1058-63.

³⁴² Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M 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* 2013;39:473-7.

³⁴³ Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X, *et al*. Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. *J Endod* 2013;39:1438-43.

³⁴⁴ Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics* 2010;22:58-78.

Los *biofilms* se han cultivado en diferentes sustratos y por diferentes períodos de tiempo en una variedad de condiciones de crecimiento diferentes en cuanto a la cantidad de oxígeno y de nutrientes^{345,346,347,348}. En la mayoría de los estudios los *biofilms* se han cultivado sólo durante 1 a 7 días^{349,350} mientras que sólo ocasionalmente, más tiempo y hasta varios meses^{351,352}. La importancia de la edad y la nutrición del *biofilm* en el comportamiento de los *biofilm* ante los antimicrobianos ha sido demostrado recientemente por Shen *et al.*³⁵³, observando que las biopelículas jóvenes (1-2 semanas) eran más sensibles a los agentes antimicrobianos, que los *biofilms* cultivados durante 3 semanas o más, es decir sobre biopelículas maduras. Stojjic *et al.*³⁵⁴, revelaron que la resistencia en biopelículas orales a los desinfectantes, era menos dependiente de la composición de la flora y más relacionado con la maduración de la biopelícula. Así, biopelículas desarrolladas en menos de 3 semanas de incubación, fueron más sensibles a su eliminación por los antimicrobianos que las biopelículas de tres semanas de maduración o más, independientemente del tipo de flora bacteriana que la compone y el tipo de agente desinfectante usado. Esta resistencia de las biopelículas maduras a los agentes antimicrobianos ha sido confirmada por diferentes estudios^{355,356,357}, atribuyéndose a la barrera física que supone la matriz polimérica extracelular producida por los microorganismos, el estado viable pero no cultivable.

³⁴⁵ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three-dimensional quantitative analysis. J Endod 2009;35:981-5.

³⁴⁶ Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. J Endod 2009;35:95-7.

³⁴⁷ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three-dimensional quantitative analysis. J Endod 2009;35:981-5.

³⁴⁸ Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. J Endod 2008;34:579-82.

³⁴⁹ Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 2006;32:527-31.

³⁵⁰ Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. J Endod 2006; 32:434-7

³⁵¹ Kishen A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis* mediated biomaterialized biofilm formation on root canal dentine *in vitro*. J Biomed Mater Res 2006;77:406-15.

³⁵² Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three-dimensional quantitative analysis. J Endod 2009;35:981-5.

³⁵³ Shen Y, Stojjic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. J Endod 2011; 37:657-61.

³⁵⁴ Stojjic S, Shen Y, Haapasalo M. 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 2013; 39:473-7.

³⁵⁵ Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X *et al.* Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. J Endod 2013; 39:1438-43.

³⁵⁶ Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J *et al.* Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dental Tubules to Disinfecting Solutions. J Endod 2016; 42:1246-50.

³⁵⁷ Dufour D, Leung V, L evesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. Endod Topics 2012;22:2-16.

La presencia de subpoblaciones de células conocidas como *persisters*, pueden contribuir a la mayor resistencia de los microorganismos en las biopelículas maduras protegiendo a las bacterias individuales frente a agentes desinfectantes^{358,359,360,361}.

Por otro lado, la elección del sustrato donde se desarrolla la biopelícula es un factor muy importante a tener en cuenta. En este estudio, se eligió como sustrato para la formación de las biopelículas, dentina humana intentando simular lo más posible las condiciones de la dentina infectada *in vivo*. El tipo de sustrato elegido, puede influir en el crecimiento y organización estructural de la biopelícula por su composición química o naturaleza³⁶², afectando tanto a la actividad metabólica de la biopelícula, así como en su susceptibilidad a los antimicrobianos³⁶³. Muchos de los estudios realizados, se desarrollan sobre sustratos inertes que no pueden proporcionar una verdadera indicación de la interacción bacteriana en la biopelícula. La elección de dentina humana como sustrato está altamente recomendado para los estudios de formación de *biofilm in vitro*, siendo un paso más para reproducir el ambiente del sistema de conductos radiculares^{364,365}. La presencia de túbulos dentinarios y la capacidad *buffer* de los componentes dentinarios se deben de tener en cuenta, ya que la presencia de dentina puede reducir significativamente la actividad antimicrobiana de NaClO, CLX y CTR ^{366,367,368}.

Para este estudio se han seleccionado cuatro soluciones irrigadoras de uso común en endodoncia y con mecanismos de acción diferentes. Hipoclorito sódico es la solución más común usada durante y después de la instrumentación, dada su potente acción antimicrobiana y su habilidad de

³⁵⁸ de la Fuente-Núñez C, Refeuville F, Fernández L, Hancock RE. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:580-9.

³⁵⁹ Chávez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007;33:652-62.

³⁶⁰ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod* 2010;36:1820-3.

³⁶¹ Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 2005;70:267-74.

³⁶² Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol* 2004;38:428-32.

³⁶³ Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *Eur J Oral Sci* 2004;112:42-7.

³⁶⁴ Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod* 2013;39:346-50.

³⁶⁵ Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.

³⁶⁶ Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-41.

³⁶⁷ Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 2007;33:917-25.

³⁶⁸ Arias-Moliz MT, Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Baca P. Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid. *J Endod* 2016;42:771-5.

disolver la materia orgánica y el tejido necrótico^{369,370}. Sin embargo, no evita el recrecimiento de microorganismos persistentes, debido a su falta de actividad antimicrobiana residual^{371,372}. Por el contrario, bis-biguanidas catiónicas y/o agentes surfactantes tales como clorhexidina (CLX) o cetrimida (CTR), con probada eficacia antibiopelícula, han demostrado sustantividad y actividad antimicrobiana residual cuando se usan como soluciones de irrigación final^{373,374,375}. Hasta la fecha muy pocos estudios han evaluado la eficacia de NaClO, CLX y CTR sobre biopelículas maduras multiespecies y la gran mayoría se han llevado a cabo sobre sustratos inertes³⁷⁶, dentina bovina o discos de hidroxiapatita^{377,378,379}. Sólo, recientemente dos estudios han evaluado la eficacia antimicrobiana de NaClO³⁸⁰ y CLX³⁸¹ sobre biopelículas multiespecies de tres semanas de maduración, en dentina humana. Otra bis-biguanida con eficacia a largo plazo³⁸² usada como irrigante endodóntico es Alexidina (ALX). Ha mostrado propiedades antimicrobianas frente a biopelículas de *E. faecalis* a muy bajas concentraciones³⁸³ y hasta nuestro conocimiento, no ha sido probada sobre biopelículas polimicrobianas en dentina.

³⁶⁹ Zehnder M. Root Canal Irrigants. J Endod 2006;32:389–98.

³⁷⁰ Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. J Endod 2009; 35:711–4.

³⁷¹ Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. J Endod 2003;29:562-4.

³⁷² Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González- Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis* infected root canals. J Endod 2011;37:1121–3.

³⁷³ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. J Endod 2012; 38:927-30.

³⁷⁴ Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. J Endod 2012;38:826–8.

³⁷⁵ Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. J Endod 2013;39:1413–5.

³⁷⁶ Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. J Endod 2010;36:70–7.

³⁷⁷ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. J Endod 2011;37:657–6.

³⁷⁸ Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X, et al. Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. J Endod 2013;39:1438–43.

³⁷⁹ Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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 2013;39:473–7.

³⁸⁰ Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. J Endod. 2016;42:1246-50

³⁸¹ Niazi SA, Al-Ali WM, Patel S, Foschi F, Mannocci F. Synergistic effect of 2% chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. Int Endod J 2015;48:1157-67

³⁸² Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. J Endod 2013;39:1413–5.

³⁸³ Silveira LF, Baca P, Arias-Moliz MT, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of alexidine alone and associated with N-acetylcysteine against *Enterococcus faecalis* biofilm. Int J Oral Sci 2013;5:146–9.

Por tanto en este estudio las soluciones testadas, incluyeron irrigantes que no se han evaluado sobre *biofilms* polimicrobianos maduros tales como ALX y combinaciones de ésta y CLX, con CTR. Por otro lado, las concentraciones y el tiempo de exposición (3 minutos), son parámetros clínicamente aceptados^{384,385}.

Una de las herramientas novedosas para investigar los *biofilms in situ*, sin alterar su estructura, en tiempo real, es la obtención de imágenes usando microscopía de barrido láser confocal (MLC) en combinación con tinciones fluorescentes específicos de viabilidad bacteriana. Es un método simple, exacto reproducible y altamente sensible para determinar la viabilidad celular^{386,387,388} al mismo tiempo que cuantifica la cantidad aproximada de células adheridas a una superficie^{389,390,391,392,393}, así como su arquitectura y la distribución espacial de la biopelícula^{394,395,396,397}. Muchos estudios han empleado, para valorar la eficacia antimicrobiana, la recuperación mecánica de las bacterias de las biopelículas y su cuantificación mediante siembra en cultivos tradicionales. Sin embargo, estos métodos poseen errores inherentes relacionados con una incompleta recuperación celular, resultando en una pobre homogeneidad de la suspensión para el cultivo.

³⁸⁴ Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod* 2012; 38:948-53.

³⁸⁵ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. *J Endod* 2014;40:1999-2002.

³⁸⁶ García-Caballero L, Quintas V, Prada-López I, Seoane J, DonosN, Tomas I. Chlorhexidine substantivity on salivary flora and plaque Like biofilm: An In Situ Model. *PLoS One* 2013;8:e83522.

³⁸⁷ Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001;46:471-6.

³⁸⁸ Hope CK, Wilson M. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods* 2006; 66:390-8.

³⁸⁹ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod* 2009;35:981-5.

³⁹⁰ Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X *et al*. Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. *J Endod* 2013;39:1438-43.

³⁹¹ Guerreiro-Tanomaru J M, de Faria-Junior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod* 2013;39:346-50.

³⁹² Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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* 2013;39:473-7.

³⁹³ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomes de Moraes I, Marciano M *et al*. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012;45:162-8.

³⁹⁴ Zaura-Arite E, Van Marle J, Ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001;80:1436-40.

³⁹⁵ Zapata RO, Bramante CM, de Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MS, *et al*. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. *J Endod* 2008;34:1198-201.

³⁹⁶ Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011;37:1380-5.

³⁹⁷ del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, *et al*. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod* 2011;37:1134-38.

Además, la evaluación de la integridad de la membrana de las células removidas del *biofilm* podría obstaculizarse por la presencia de células en estado viable, pero metabólicamente inactivas, que son incapaces de dividirse y por tanto formar colonias. Esto permite una sobreestimación de la eficacia de los antimicrobianos evaluados³⁹⁸. Por ello, y a pesar de sus deficiencias, la tinción de la viabilidad y la evaluación con MLC, se ha convertido en el método de elección para medir la muerte bacteriana en *biofilms*. La metodología permite medir la proporción relativa de bacterias muertas en cada espécimen, lo que no ha sido posible utilizando métodos de cultivo³⁹⁹. Además, MLC explora la distribución y estructura de *biofilms* en 2-D y 3-D, produciendo cantidades relativamente grandes de datos de imagen de alta resolución. La cantidad de datos adquiridos por MLC requiere métodos automáticos de análisis de imágenes que sean precisos y ahorren tiempo, para que la información visual pueda ser transformada en números. *bioImage_L* es un novedoso software de análisis de imágenes para la caracterización automática de la estructura y distribución de *biofilms* diseñado por Chaves de Paz⁴⁰⁰. La novedad de *bioImage_L* es la inclusión de un algoritmo que identifica automáticamente tonalidades de color sin tener que realizar una conversión monocromática previa en canales RGB separados.

Recientemente diversos estudios, han evaluado con este método los *biofilms* analizando su estructura y distribución espacial^{401,402}, así como la efectividad de protocolos de desinfección en endodoncia^{403,404,405,406,407,408}.

³⁹⁸ Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010;36:70–7.

³⁹⁹ Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 2014;40:509-14.

⁴⁰⁰ Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *App Environ Microbiol* 2009; 75:1734–9.

⁴⁰¹ Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 1998;43:277–85.

⁴⁰² Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 2000;79:21–7.

⁴⁰³ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomes de Moraes I, Marciano M *et al*. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012;45:162–8.

⁴⁰⁴ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardineli N, de Moraes IG, Duarte MA. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intraorally infected dentin. *Acta Odontol Scand* 2013;71:424-31.

⁴⁰⁵ del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Hungaro Duarte MA, de Andrade FB, Cavenago BC, Villas-Bôas MH. Application of laser scanning microscopy for the analysis of oral biofilm dissolution by different endodontic irrigants. *Dent Res J* 2014;11:442-7.

⁴⁰⁶ Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J* 2012;45:363-71.

⁴⁰⁷ del Carpio-Perochena A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AG, Cavenago BC, Marciano MA *et al*. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral Investig*. 2015;19:2067-73

⁴⁰⁸ Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J *et al*. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. *J Endod* 2016;42:1246-50.

5.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES ANTIMICROBIANAS FRENTE A BIOPELÍCULAS POLIMICROBIANAS MADURAS

Los resultados de este estudio muestran que ninguna de las soluciones irrigadoras evaluadas fue capaz de lograr la completa limpieza de la dentina, ni de erradicar completamente las células viables del *biofilm* polimicrobiano. Lo cual es concordante con los resultados de estudios previos^{409,410,411,412}. Los mejores resultados en todos los parámetros evaluados, se obtuvieron con NaClO, que exhibió la mejor eficacia *antibiofilm* en comparación con las demás soluciones evaluadas. Este grupo fue el único capaz de alterar significativamente la estructura de la biopelícula reduciendo sustancialmente el biovolumen total y el porcentaje de células viables en las muestras dentinarias infectadas. Mostró un biovolumen residual extremadamente bajo, lo cual era de esperar ya que este antiséptico es un oxidante altamente reactivo que actúa disolviendo y provocando la disrupción de la estructura del *biofilm*⁴¹³, gracias a su capacidad para romper los enlaces glucosídicos presentes en la EPS.⁴¹⁴ y está demostrado que la mejor estrategia para eliminar *biofilms* es disolver su estructura⁴¹⁵. Estos resultados son concordantes con los de las investigaciones que han demostrado la gran eficacia de NaClO sobre biopelículas multiespecies^{416,417} y monoespecies^{418,419}. Stojicic *et al.*⁴²⁰ mostraron que NaClO destruyó *biofilms* de *E.faecalis in vitro* en tan sólo 3 minutos. Sin embargo, en este estudio, usando un *biofilm*

⁴⁰⁹ Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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 2013;39:473–7.

⁴¹⁰ Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X *et al.* Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. J Endod 2013;39:1438–43.

⁴¹¹ del Carpio-Perochena A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AG, Cavenago BC, Marciano MA *et al.* Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. Clin Oral Investig 2015;19:2067–73.

⁴¹² Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardini N, de Moraes IG *et al.* The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intraorally infected dentin. Acta Odontol Scand 2013;71:424–31.

⁴¹³ Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. J Endod 2006; 32:434–7

⁴¹⁴ Tawakoli PN, Ragnarsson KT, Rechenberg DK, Mohn D, Zehnder M. Effect of endodontic irrigants on biofilm matrix polysaccharides. Int Endod J 2017;50:153–160.

⁴¹⁵ Tote K, Horemans T, VandenBerghe D, Maes L, Cos P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl Environ Microbiol 2010;76:3135–42.

⁴¹⁶ del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS *et al.* Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. J Endod 2011;37:1134–8.

⁴¹⁷ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomes de Moraes I, Marciano M *et al.* Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. Int Endod J 2012;45:162–168.

⁴¹⁸ Chávez de Paz LE, Bergholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. J Endod 2010;36:70–7.

⁴¹⁹ Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Junior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrinide. Confocal laser scanning microscopy. Int Endod J 2014;47:1058–63.

⁴²⁰ Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. Int Endod J 2012;45:363–71.

polimicrobiano y de forma similar a estudios clínicos y estudios *in vitro* que usaron modelos de *biofilm* formados *in situ*^{421,422}, e infección intratubular^{423,424}, la completa eliminación de las células no fue conseguida con NaClO. El hecho de que no erradicase, no constituyó un hallazgo inusual, dado que la más fuerte estructura y patogenicidad del *biofilm* polimicrobiano aportó mayor protección frente al NaClO. Por tanto la eficacia de las soluciones antimicrobianas está afectada por las especies bacterianas que habitan en el *biofilm*⁴²⁵. A pesar de todo, en este estudio consiguió un porcentaje de muerte superior al 95%. La persistencia de células viables podría también ser facilitada por la características irregulares de la dentina la cual incluye túbulos dentinarios y porque NaClO puede inactivarse por sustancias como la biomasa bacteriana, el colágeno⁴²⁶ y capacidad *buffer* de los componentes dentinarios⁴²⁷, contrarrestando sus efectos. Además una biopelícula madura, genera una mayor resistencia a NaClO⁴²⁸.

Clorhexidina al 2% mostró una eficacia limitada en comparación con NaClO, con un porcentaje de muerte del 37,08%. Tras tres minutos de contacto con CLX, los especímenes dentinarios mostraron un biovolumen residual dos veces mayor al de NaClO y sin diferencias con el grupo control de agua destilada. De forma similar, Shen *et al.*⁴²⁹, usando MLC, observaron que el digluconato de clorhexidina al 2% no fue capaz de disolver el *biofilm* en ninguno de los 3 periodos de tiempo estudiados (1, 3 y 10 min). De acuerdo con esta afirmación, la principal implicación de los *biofilms* residuales es que pueden actuar como escudo protector para las bacterias dentro de los túbulos dentinarios⁴³⁰. El limitado efecto antimicrobiano (% viabilidad = 62.92%) que observamos para la solución de CLX al 2% es similar a los resultados obtenidos por Shen *et al.*⁴³¹,

⁴²¹ McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. J Endod 2005;31:359–63.

⁴²² Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardineli N, de Moraes IG *et al.* The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intraorally infected dentin. Acta Odontol Scand 2013;71:424–31.

⁴²³ Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. J Endod 2014;40:509–14.

⁴²⁴ Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J *et al.* Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. J Endod 2016;42:1246–50.

⁴²⁵ Elias S, Banin E. Multispecies biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiol Rev 2012;36:990–1004.

⁴²⁶ Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. Dent Clin North Am 2010; 54:291–312.

⁴²⁷ Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. J Endod 2007; 33:917–25.

⁴²⁸ Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono and dual species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus* (micromonas) micros. J Endod 2007;33:819–22.

⁴²⁹ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: A three-dimensional quantitative analysis. J Endod 2009;35:981–5.

⁴³⁰ Marley JT, Ferguson DB, Hartwell GR. Effects of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: Short-term results. J Endod 2001;27:775–8

⁴³¹ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. J Endod 2011;37: 657–61.

Du *et al.*⁴³², Stojicic *et al.*⁴³³ y Ordinola *et al.*⁴³⁴ frente a biopelículas multiespecies en diferentes sustratos. Recientemente Yang *et al.*⁴³⁵, usando un modelo de infección dentinaria intratubular y con el objetivo de comparar la eficacia de CLX y NaClO frente a biopelículas mono-especies y multiespecies, demostraron la menor eficacia de CLX frente a NaOCl en estos últimos. La limitada eficacia de CLX puede deberse a que aunque es un potente antibacteriano, no es capaz de disolver materia orgánica⁴³⁶, ni romper las fuerzas cohesivas de la biopelícula⁴³⁷ por lo que bajo condiciones clínicas, su eficacia podría esperarse siempre y cuando, las paredes del conducto estuviesen bien limpias, dada su escasa penetración en las capas profundas de la arquitectura del *biofilm*⁴³⁸. Además tiene menor actividad frente a Gram-negativos⁴³⁹. Por estas razones no se recomienda como solución irrigante principal para la desinfección en endodoncia, y si como solución de irrigación final por su efectividad antimicrobiana residual⁴⁴⁰.

La otra bis-biguanida evaluada, ALX al 2%, obtuvo en este estudio, mejores valores que CLX al 2% en cuanto al porcentaje de muerte de las células de las biopelículas (55,91%). Silveira *et al.*⁴⁴¹, demostraron erradicación de biopelículas de *E. Faecalis* a muy bajas concentraciones de ALX y en otro estudio, usada al 1%, erradicó un 99,99% de biopelículas de *S. mutans* en dentina⁴⁴². Su empleo en concentraciones del 1% sobre dentina infectada con *E. faecalis* han mostrado ser igual de efectivas que CLX al 2%⁴⁴³ y aplicada durante 1 minuto proporciona un efecto antimicrobiano residual más largo que CLX⁴⁴⁴. Aunque ambas son bis-biguanidas catiónicas, que producen

⁴³² Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X *et al.* Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. J Endod 2013;39:1438–43.

⁴³³ Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. Int Endod J 2012;45:363-71.

⁴³⁴ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomes de Moraes I, Marciano M *et al.* Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. Int Endod J 2012;45:162–168.

⁴³⁵ Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J *et al.* Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dental tubules to disinfecting solutions. J Endod 2016;42:1246-50.

⁴³⁶ Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J 2009; 42:288-302.

⁴³⁷ Tawakoli PN, Ragnarsson KT, Rechenberg DK, Mohn D, Zehnder M. Effect of endodontic irrigants on biofilm matrix polysaccharides. Int Endod J 2017;50:153-160.

⁴³⁸ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomes de Moraes I, Marciano M *et al.* Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. Int Endod J 2012;45:162–168.

⁴³⁹ Emilson CG. Susceptibility of various microorganism to chlorhexidine. Scand J Dent Res 1977;85:255-65

⁴⁴⁰ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. J Endod 2012;38:927-30.

⁴⁴¹ Silveira LF, Baca P, Arias-Moliz MT, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of alexidine alone and associated with N-acetylcysteine against *Enterococcus faecalis* biofilm. Int J Oral Sci 2013;5:146-9.

⁴⁴² Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;20:13:41.

⁴⁴³ Kim HS, Chang SW, Baek SH, Han SH, Lee Y, Zhu Q *et al.* Antimicrobial effect of alexidine and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* infection. Int J Oral Sci 2013; 5:26–31.

⁴⁴⁴ Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. J Endod 2013;39:1413–5.

DISCUSIÓN

disrupción de la integridad de la membrana citoplasmática, causando la filtración de los contenidos intracelulares, existen diferencias estructurales entre ambas. En este estudio, los buenos resultados obtenidos con ALX al 2% sobre CLX al 2%, en un tiempo de exposición de 3 minutos sobre biopelículas polimicrobianas podrían atribuirse en parte a su mayor velocidad de acción bactericida, dada la mayor afinidad de ALX a los lipopolisacáridos y ácidos lipoteicoicos, lo que podría conducir a una permeabilización más rápida de la membrana bacteriana⁴⁴⁵.

Cetrimida al 0,2% por su parte, mostró resultados intermedios similares a ALX al 2%, con valores de biovolumen muy parecidos y un porcentaje de células viables sin diferencias significativas entre ambos. CTR, ha mostrado actividad antimicrobiana frente a biopelículas de *S. mutans* en dentina consiguiendo erradicar del 100% en los especímenes tratados⁴⁴⁶. Además de erradicar biopelículas de *E. faecalis in vitro*⁴⁴⁷ y *ex vivo*⁴⁴⁸, muestra actividad antimicrobiana residual a largo plazo⁴⁴⁹.

Es interesante destacar, que en este estudio la adición de este surfactante a las bis-biguanidas, incrementó el efecto antibacteriano de éstas últimas, siendo especialmente notable con la combinación de CTR al 0,2% a CLX al 2%, reduciendo el porcentaje de células viables en un 35%. Este incremento de la capacidad antimicrobiana de CLX mezclado con surfactantes ha sido previamente observado por otros estudios de *biofilms* multiespecies formados a partir de placa subgingival en discos de hidroxiapatita⁴⁵⁰ y sobre *E. faecalis*^{451,452}, confirmándose en el presente estudio, usando como sustrato dentina radicular humana y un *biofilm* polimicrobiano de origen endodóntico. Se ha demostrado que cuando CTR se combina con CLX existe sinergismo ya que ambos actúan sobre la pared celular de las bacterias⁴⁵³.

⁴⁴⁵ Zorko M, Jerala R. Alexidine and Chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:730–7.

⁴⁴⁶ Ruíz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014;20;13:41.

⁴⁴⁷ Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod* 2010;36:87-90.

⁴⁴⁸ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J Endod* 2012;38:927-30.

⁴⁴⁹ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González- Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod* 2011;37:363-6.

⁴⁵⁰ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37:657–61.

⁴⁵¹ Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Junior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J* 2014;47:1058–63.

⁴⁵² Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, González- Rodríguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod*. 2010 36:87-90

⁴⁵³ Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006; 32:138-41.

La combinación de CTR al 0,2% a ALX al 2% en este estudio, también tuvo un efecto sinérgico, pero menos que CHX al 2% + CTR al 0,2% y logró una reducción del 11% en el porcentaje de células viables. Este resultado es muy similar y no estadísticamente significativo con respecto al alcanzado cuando se combina con CLX.

El efecto beneficioso del CTR solo o combinado se debe a su naturaleza catiónica. Actúa rompiendo las fuerzas cohesivas en la matriz de polisacáridos extracelulares y membranas bacterianas, promoviendo la disrupción del *biofilm*⁴⁵⁴. Es un detergente que tiene la ventaja de ser muy poco irritante, y no interfiere con las bis-biguanidas. También tiene la capacidad de reducir la tensión superficial y aumentar la humectabilidad de las soluciones de irrigación, mejorando así la penetración de éstas a lugares de difícil acceso como es el caso de los túbulos dentinarios⁴⁵⁵. Otro beneficio potencial de usar CTR solo y combinado con CHX o ALX es su probada sustantividad⁴⁵⁶. Estas características justifican su inclusión como componente de soluciones irrigadoras usadas en endodoncia tales como QMiX®, Cetrexidin®, SmearClear®, REDTA® y EDTAC®, entre otras. Nuestros resultados sobre biopelículas polimicrobianas maduras son por tanto consistentes con los de estudios previos que demuestran el efecto beneficioso de añadir surfactantes, como CTR, a las soluciones antimicrobianas^{457,458,459,460}.

⁴⁵⁴ Simões M, Pereira MO, Vieira MJ. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res.*2005; 39:5142-52.

⁴⁵⁵ Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod* 2006;32:1091-3.

⁴⁵⁶ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J Endod* 2012; 38:927-30.

⁴⁵⁷ Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: A three-dimensional quantitative analysis. *J Endod* 2009;35:981-5.

⁴⁵⁸ Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2012;38:826-8.

⁴⁵⁹ Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis* infected root canals. *J Endod* 2011;37:1121-3.

⁴⁶⁰ Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod* 2012; 38:948-53.

DISCUSIÓN

El empleo del modelo de *biofilm ex vivo* usado en este estudio, puede servir para conocer mejor cómo los microorganismos crecen en comunidades unidas a las paredes del conducto radicular o para identificar variables en las cuales las bacterias pueden sobrevivir aplicando fuertes componentes antibacterianos, lo que lleva a un mejor entendimiento de la persistencia de los mismos y como combatirlos clínicamente. Sin embargo, es difícil reproducir la situación clínica real en la que los microorganismos crecen dentro de los conductos radiculares o cómo las soluciones irrigadoras difunden dentro del sistema de conductos radiculares hasta un nivel apical, ni identificar las posibles especies que pueden sobrevivir al stress antimicrobiano. En este sentido, se necesitan futuras investigaciones como el uso de un modelo de infección intratubular o estudios moleculares o *in vivo* que confirmen los resultados obtenidos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

PRIMERA: Ninguna de las soluciones irrigadoras evaluadas erradicó completamente las biopelículas polimicrobianas de origen endodóntico formadas en dentina radicular.

SEGUNDA: Hipoclorito sódico al 2,5% fue la solución que mostró mejor eficacia antimicrobiana, siendo capaz de reducir notablemente tanto el biovolumen total como el porcentaje de células viables en las biopelículas maduras, seguido de alexidina al 2% y cetrimida al 0,2%.

TERCERA: La adición de cetrimida al 0,2% a clorhexidina al 2%, mejoró sustancialmente la actividad antimicrobiana de clorhexidina sobre biopelículas polimicrobianas.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721–32.
- Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medication. *J Endod* 2005;31:30-6.
- Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD *et al*. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* 2013;7:1016-25.
- Al-Ahmad A, Follo M, Selzer AC, Hellwig E, Hannig M, Hannig C. Bacterial colonization of enamel *in situ* investigated using fluorescence *in situ* hybridization. *J Med Microbiol* 2009;58:1359–66.
- Allison D.G. The biofilm matrix. *Biofouling* 2003;19:139–50.
- Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. *Int Endod J* 1990;23:20-7.
- Arias-Molíz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod* 2009; 35:711-4.
- Arias-Molíz MT, Ferrer-Luque CM, González- Rodríguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod* 2010;36:87-90.
- Arias-Molíz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. *J Endod* 2014;40:1999–2002.
- Arias-Molíz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA *et al*. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 2015;48:1188-93.
- Arias-Molíz MT, Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Baca P. Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid. *J Endod* 2016;42:771-5.
- Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J* 2007;52:64–82.
- Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001;46:471–6.
- Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Molíz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *J Endod* 2011a; 37:1121-3.
- Baca P, Junco P, Arias-Molíz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod* 2011;37:363-6.
- Baca P, Junco P, Arias-Molíz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J Endod* 2012;38:927-30.
- Baker PJ, Coburn RA, Genco RJ, Evans RT. Structural determinants of activity of chlorhexidine and alkyl bisbiguanides against the human oral flora. *J Dent Res* 1987;66:1099–106.
- Barer MR, Gribbon LT, Harwood CR, Nwoguh CE. The viable but nonculturable hypothesis and medical microbiology. *Rev Med Microbiol* 1993;4:183–91.
- Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Molíz MT, Ruiz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. *J Endod* 2013;39:1413–5.
- Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 1992;18:605-12.
- Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *J Endod* 1981;7:100-4.
- Biswas S, Biswas I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 2005;73:6923–34.
- Bloomfield SF, Miles GA. Antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium-hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol* 1979;46:65–73.
- Boyd A. Confocal optical microscopy. *Microscopy and analysis*. New York: Springer Verlag 1998:7-13.

- Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:126-31.
- Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R: Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; 13:20–26.
- Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *J Endod* 2008;34:579–82.
- Brito PR, Souza LC, Machado de Oliveira JC, Alves FR, De-Deus G, Lopes HP *et al.* Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an *in vitro* study. *J Endod* 2009;35:1422–7.
- Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;55:307–12.
- Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse lactobacillus species present in advanced dental caries. *Clin Microbiol* 2004;42:3128-36.
- Canalda Sahli C. Preparación de los conductos radiculares. En: Canalda Sahli C, Brau Aguadé E. (Eds). *Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas*. 3ª Ed. Barcelona, España Masson; 2014;15:186.
- Campanhã MTN, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. *J Lipid Res* 1999;40:1495–500.
- Camps J, Pommel L, Aubut V, Verhille B, Satoshi F, Lascola B *et al.* Shelf life, dissolving action, and antibacterial activity of a neutralized 2.5% sodium hypo- chlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:66–73 .
- Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza- Filho FJ. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater* 2010;26:779–85.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1771–6.
- Chávez de Paz LE, Molander A, Dahlen G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *Int Endod J* 2004;37:579–87.
- Chávez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007;33:652-62.
- Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlen G, Svensater G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J* 2007;40:344-55.
- Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environl Microbiol* 2009; 75:1734–9.
- Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010; 36:70–7.
- Chávez de Paz LE. Página web: http://www.bioimager.com/Luis_chavez_de_paz. Acceso el 30 de mayo de 2017.
- Chu FC, Leung WK, Tsang PC, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *J Endod* 2006;32:17–23.
- Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. *J Endod* 2006;32:434–7.
- Clinton A, Carter T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. *Lab Med* 2015;46:277-84.
- Cloete TE, Jacobs L, Brözel VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation* 1998;9:23-37.
- Costerton JW, Cook G, Lamont R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. En: Newman HN, Wilson M (eds). *Dental plaque Revisited. Oral biofilms in health and disease*. Cardiff, UK: BioLine 1995:5-14.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Scienc* 1999;284:1318-22.

BIBLIOGRAFÍA

- Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* 2000; 88:22–30.
- Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980;49:175-7.
- D’Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999;25:351–3.
- Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:768–72.
- Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:114–22.
- del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, *et al*. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod* 2011;37:1134–38.
- del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Hungaro Duarte MA, de Andrade FB, Cavenago BC, Villas-Bôas MH. Application of laser scanning microscopy for the analysis of oral biofilm dissolution by different endodontic irrigants. *Dent Res J* 2014; 11:442-7.
- del Carpio-Perochena A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AG, Cavenago BC, Marciano MA *et al*. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multispecies biofilms. *Clin Oral Investig* 2015; 19:2067-73.
- de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock RE. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:580-9.
- Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *Eur J Oral Sci* 2004; 112:42-7.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH *et al*. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010;192:5002-17.
- Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:69-75.
- Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28:689-93.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167–93.
- Dostie S, Alkadi LT, Owen G, Bi J, Shen Y, Haapasalo M *et al*. Chemotherapeutic decontamination of dental implants colonized by mature multispecies oral biofilm. *J Clin Periodontol* 2017; 44:403-9.
- Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X *et al*. Effect of Modified Nonequilibrium Plasma with Chlorhexidine Digluconate against Endodontic Biofilms *in Vitro*. *J Endod* 2013; 39:1438–43.
- Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 2014;40:509-14.
- Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006; 32:527-31.
- Dufour D, Leung V, L evesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Topics* 2012;22:2–16.
- Edwardsson S. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. *Odontol Revy* 1974;25:1-143.
- Elasri MO, Miller RV. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2025–31.
- Elias S, Banin E. Multispecies biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36:990–1004.
- El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:560-9.
- Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977;85:255-65.

- Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113-7.
- Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod* 2004;30:84-7.
- Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJR. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 2006;114:278-85.
- Flach N, Böttcher DE, Parolo CC, Firmino LB, Malt M, Lammers ML, Grecca FS. Confocal microscopy evaluation of the effect of irrigants on *Enterococcus faecalis* biofilm: An *in vitro* study. *Scanning* 2016;38:57-62.
- Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Baca P. Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrimide with chelating agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2010; 36:1673-5.
- Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2012; 38:826-8.
- Ferrer-Luque MC, Arias-Moliz TM, Ruiz-Linares M, Martínez García ME, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* infected root canals. *Int J Oral Sci* 2014;6:46-9.
- Flemming H-C, Wingender: The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:623-33.
- Fuxman Bass JI, Russo DM, Gabelloni ML, Geffner JR, Giordano M, Catalano M *et al.* Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Immunol* 2010;184:6386-95.
- Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:359-76.
- García-Caballero L, Quintas V, Prada-López I, Seoane J, DonosN, Tomas I. Chlorhexidine substantivity on salivary flora and plaque Like biofilm: An In Situ Model. *PLoS One* 2013;8:e83522.
- Garvey LH, Roed-Petersen J, Husum B. Anaphylactic reactions in anaesthetised patients-four cases of chlorhexidine allergy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:1290-4.
- George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31:867-72.
- Gerhardt CR, Eppendorf K, Kozłowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 2004; 37:272-80.
- Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod* 2006;32:1091-3.
- Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Texeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424-8.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.
- Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC *et al.* Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod* 2006;32:937-40.
- Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod* 2013;39:346-50.
- Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Júnior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J* 2014;47:1058-63.
- Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.
- Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000;33:126-31.

BIBLIOGRAFÍA

- Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JMI. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics* 2005;10:77–102.
- Haapasalo M, Quian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontics medicaments. *J Endod* 2007;33:917-25.
- Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin of North America* 2010; 54:291–312.
- Hahnel S, Rosentritt M, Burgers R, Handel G. Surface properties and *in vitro* *Streptococcus mutans* adhesion to dental resin polymers. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:2619–27.
- Hales JJ, Jackson CR, Everett AP, Moore SH. Treatment protocol for the management of a sodium hypochlorite accident during endodontic therapy. *Gen Dent* 2001;49:278-81.
- Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *J Med Microbiol* 2010;59:1–7.
- Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003; 36:75-85.
- Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 2009;88:982-90.
- Hope CK, Wilson M. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods* 2006; 66:390–8.
- Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PØ *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011;3:55-65.
- Huang M, Meng L, Fan M, Hu P, Bian Z. Effect of biofilm formation on virulence factor secretion via the general secretory pathway in *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2008;53:1179-85.
- Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J* 2000;33:186-93.
- Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT *et al.* Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207-14.
- Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Top Microbiol Immunol* 2008;322: 67–84.
- James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini Ed, Secor P, Sestrich J. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regen* 2008;16:37-44.
- Järvinen H, Pienihäkkinen K, Huovinen P, Tenovuoto J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to antimicrobial agents after short-term oral chlorhexidine treatments. *Eur J Oral Sci* 1995;103:32-5.
- Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994; 20:276-8.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. *Streptococcal* adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:175-200.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
- Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009;73:310-47.
- Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod* 2006; 32:312-8.
- Kim HS, Han SH, Oh SR, Lim SM, Gu Y, Kum KY. Analysis of para-chloraniline after chemical reaction between alexidine and sodium hypochlorite using TOF-SIM spectrometry: a preliminary study. *J Kor Acad Cons Dent* 2010;35:295–301.
- Kim HS, Zhu Q, Han SH, Jung IY, Son WJ, Chang SW *et al.* Chemical interaction of alexidine and sodium hypochlorite. *J Endod* 2012;38:112–6.
- Kim HS, Chang SW, Baek SH, Han SH, Lee Y, Zhu Q *et al.* Antimicrobial effect of alexidine and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* infection. *Int J Oral Sci* 2013;5:26–31.
- Kishen A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis* mediated biomaterialized biofilm formation on root canal dentine *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 2006;77:406–15.

- Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod* 2008;34, 850–4.
- Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics* 2010; 22: 58-78.
- Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993;175:3247-52.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:471-80.
- Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod* 2000; 26:315-7.
- Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol* 2010;192:3024–32.
- Kuboniwqa M, Tribble GD, Hendrikson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2012;9:311–323.
- Kugler R, Bouloussa O, Rondelez F. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology* 2005; 151:1341–8.
- Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan JS *et al*. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:100-5.
- Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:318-22.
- Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC. Evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002; 28:815-8.
- Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999;25:167–71.
- Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 2005;70:267-74.
- Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ *et al*. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:61-8.
- Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003; 29:565-6.
- Listgarten MA, Mayo H, Amsterdam M. Ultrastructure of the attachment device between coccal and filamentous microorganisms in "corn cob" formations of dental plaque. *Arch Oral Biol* 1973;18:651-6.
- Lo AW, Seers CA, Boyce JD, Dashper SG, Slakeski N, Lissel JP *et al*. Comparative transcriptomic analysis of *Porphyromonas gingivalis* biofilm and planktonic cells. *BMC Microbiol* 2009;29;9:18.
- Loesche WJ. Importance of nutrition in gingival crevice microbial ecology. *Periodontics* 1968;6:245-9.
- Loesche WJ, Syed SA. The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentin. *Caries Res* 1973;7:201-16.
- Love RM. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. *Endod Dent Traumatol* 1996;12:289-93.
- Lleó MM, Tafi MC, Signoretto C, Dal Cero C, Canepari P. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. *FEMS Microbiol Ecol* 1999;30:345–53.
- Lleó, MM, Pierobon S, Tafi MC, Signoretto C, Canepari P. mRNA detection by RT-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl Environ Microbiol* 2000;66: 4564–7.
- Lleó MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but nonculturable state. *J Appl Microbiol* 2001;91:1095–102.
- Lleó MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Pruzzo C, Canepari P. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. *Letters in Applied Microbiology* 2005, 40: 289–94.
- Lloyd D, Hayes AJ. Vitality and viability of microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 1995;133:1-7.

BIBLIOGRAFÍA

- Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011; 37:1380-5.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000354.
- Machado Silveira LF, Baca P, Arias-Moliz MT, Rodríguez Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of alexidine alone and associated with N-acetylcysteine against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Int J Oral Sci* 2013;5:146-149.
- Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Peixoto RS *et al.* Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:14-8.
- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9:34-9.
- Marley JT, Ferguson DB, Hartwell GR. Effects of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: Short-term results. *J Endod* 2001;27:775-8
- Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-94.
- Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J* 2012; 212:601-6.
- Martínez-Nístal A, Sampedro A, Matsuguchi M. Introducción a la microscopía láser confocal. En: Sampedro A, de los Troyos JR, Martínez-Nístal A. (Eds). *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*. Universidad de Oviedo, Servicio de publicaciones: 1995:16.
- Martínez-Nístal A, Sampedro A, Matsuguchi M. Introducción a la microscopía láser confocal. En: Sampedro A, de los Troyos JR, Martínez-Nístal A. (Eds). *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*. Universidad de Oviedo, Servicio de publicaciones: 1995:17.
- Martínez-Nístal A, Sampedro A, Matsuguchi M. Introducción a la microscopía láser confocal. En: Sampedro A, de los Troyos JR, Martínez-Nístal A. (Eds). *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*. Universidad de Oviedo, Servicio de publicaciones: 1995:19.
- McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:703-15.
- McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod* 2005;31:359-63.
- Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:295-8.
- Merianos JJ. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. En: Block SS, (ed.). *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Philadelphia: Lea & Febiger 1991; 225-62.
- Mitchell HL, Dashper SG, Catmull DV, Paolini RA, Cleal SM, Slakeski N *et al.* *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin-antitoxin systems and transposases. *Microbiol* 2010;156:774-88.
- Minsk M. Microscopy Apparatus, U.S.A 1957; United State Patent 3013467.
- Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009;42:288-302.
- Monroe, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* 2007; 5:e307.
- Moorer W, Wesselink P. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982;15:187-96.
- Morgan JA, Rhodes W, Rickup RW. Survival of nonculturable *Aeromonas salmonicida* in lake water. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:874-80.
- Muson MA, Pitt-Ford T, Chony B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 2002;81:761-6.
- Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006;39:249-81.
- Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* 2009;19:636-43.

- Netuschil L, Reisch E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 1998; 43:277–285.
- Niazi SA, Clark D, Do T, Gilbert SC, Foschi F, Mannocci F *et al*. The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. *Int Endod J* 2014; 47:756-68.
- Niazi SA, Al-Ali WM, Patel S, Foschi F, Mannocci F. Synergistic effect of 2% chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. *Int Endod J* 2015; 48:1157-67.
- Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002;28:679-83.
- Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 2005;43: 93–100.
- Oliver JD, Bockian R. In vivo resuscitation and virulence towards mice of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:2620–3.
- Onçağ O, Hosgör M, Hilmioğlu S, Zekiöğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423- 432.
- Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomes de Moraes I, Marciano M *et al*. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012; 45:162–8.
- Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardineli N, de Moraes IG *et al*. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontol Scand* 2013; 71:424-31.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79.
- Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono and dual species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus* (micromonas) micros. *J Endod* 2007;33:819–22.
- Pan P, Barnett ML, Coelho J, Brogdon C, Finnegan MB. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol* 2000;27: 256–261.
- Palmer RJ, Haagsen JAJ, Neu TR, Sternberg C. Confocal microscopy of biofilms-spatiotemporal approaches. En: James B. Pawley (Eds). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3rd ed. New York: Springer Verlag; 2006; 51:875.
- Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. *In vitro* antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *Int Endod J* 2010; 43:528–35.
- Pashley DH. Clinical considerations in microleakage. *J Endod* 1990;16:70-7.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA *et al*. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-83.
- Pawley JB. Fundamental limits in confocal microscopy. En: James B. Pawley (Eds). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3rd ed. New York: Springer Verlag; 2006; 1:5.
- Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2001; 27:76-81.
- Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J* 1995;28:95-9.
- Peters OA, Schonenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J* 2001;34: 221–30.
- Petran M, Hadravsky M, Egger D, Galambos R. Tandem scanning reflected light microscope. *J Opt Soc Am* 1968;58:660-664.
- Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod* 2005;31:380–6.
- Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-41.
- Pumarola Suñé J. Microbiología endodóntica. En: Canalda Sahli C, Brau Aguadé E (Eds). *Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas*. 3rd Ed. Barcelona, España Masson; 2014;4:26.

BIBLIOGRAFÍA

- Pumarola Suñé J. Microbiología endodóntica. En: Canalda Sahli C, Brau Aguadé E (Eds). Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas. 3ª Ed. Barcelona, España Masson; 2014;4:28.
- Rahman I, Shahamat M, Kirchman PA, Rissek-Cohen E, Colwell RR. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. Appl Environ Microbiol 1994;60:3573–8.
- Ricucci D, Martorano M, Bate AL, Pascon EA. Calculus-like deposit on the apical external root surface of teeth with post-treatment apical periodontitis: report of two cases. Int Endod J 2005;38:262-71.
- Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod 2010;36:1277–88.
- Roberts AP, Mullany P. Oral Biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. Expert Rev Anti Infect 2010; 20:1441–50.
- Roberts WR, Addy M. Comparison of the bisbiguanide antiseptics alexidine and chlorhexidine: I. Effect on plaque accumulation and salivary bacteria. J Clin Periodontol 1981;8:213-9.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN, Coelho AMA. Red Complex (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91:468-71.
- Rôças IN and Siqueira JF. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol 2008;46:3599-606.
- Rôças I, Siqueira JF Jr. *In vivo* antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. J Endod 2011;37:304–10.
- Rolla G, Baastad KL. Chlorhexidine—a new remedy in tooth care? Nor Tannlaegeforen Tid 1970;80:248-55.
- Rollins DM, Colwell RR. Viable but non-culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl Environ Microbiol 1996;52:531–8.
- Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;98:488–92.
- Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;20;13:41.
- Russell AD, Chopra I. Understanding antibacterial action and resistance. 2ª Ed. Ellis Horwood. Chichester;1996.
- Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. Clin Microbiol Rev 1997;10:597–610.
- Ryan S. Chlorhexidine as a canal irrigant: a review. Compend Contin Educ Dent 2010;31:338-42.
- Sauer K, Camper AK, Erlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol 2002;184:1140–54
- Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. Int Endod J 2005;38:735–42.
- Sedgley CM. The influence of root canal sealer on extended intracanal survival of *Enterococcus faecalis* with and without gelatinase production ability in obturated root canals. J Endod 2007;33:561–6.
- Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Endod Dent Traumatol 1995;11:6-9.
- Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. Int Endod J 2006; 39: 878-85.
- Scheie AA, Petersen FC. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral disease Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15:4–12.
- Shen Y, Qian W, Chung C, et al. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three dimensional quantitative analysis. J Endod 2009;35:981–5.
- Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture. J Endod 2010;36:1820–3.
- Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. J Endod 2011; 37:657–61.

- Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 2003;185:2066-79.
- Signoretto C, Lleó MM, Tafi MC, Canepari P. Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Nonculturable State. *Appl Environ Microbiol* 2000;6:1953-9.
- Simões M, Pereira MO, Vieira MJ: Effects of mechanical stress on biofilms challenged by different chemical. *Water Res* 2005;39:5142-52.
- Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal *in vitro*. *Int Endod J* 1997;30:279-82
- Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; 34:1-10.
- Siqueira JF Jr, Lopes HP. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 2001;34:216-20.
- Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo A. *Actinomyces* species, *streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod.* 2002;28:168-72.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002;28:181-4.
- Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:85-94.
- Siqueira JF, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2005;43:3314-9.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291-301.
- Silveira LF, Baca P, Arias-Moliz MT, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of alexidine alone and associated with N-acetylcysteine against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Int J Oral Scienc* 2013; 5:146-9.
- Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16:498-504.
- Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34:300-7.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2002;28:12-55.
- Souza M, Cecchin D, Farina AP, Leite CE, Cruz FF, Pereira CC. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod* 2012; 38:1249-52.
- Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol* 2004;38:428-32.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-8.
- Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J* 2012; 45:363-71.
- Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. 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* 2013; 39:473-7.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002;56: 187-209.
- Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* 2009;35:950-7.
- Suman JM, Kuga MC, Da Rosa RA, Santini MF, Grazziotin-Soares R, Montagner F *et al.* Antibacterial Activity of Chlorhexidine After Final Irrigation with Ethanol: CLSM and Culture-Based Method Analysis. *Microsc ResTech* 2015; 78:682-7.
- Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:257-62.
- Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;18:427-30.

BIBLIOGRAFÍA

- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 2006;32:93–8.
- Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. Pol J Microbiol. 2014;63:127-35.
- Tawakoli PN, Ragnarsson KT, Rechenberg DK, Mohn D, Zehnder M. Effect of endodontic irrigants on biofilm matrix polysaccharides. Int Endod J 2017;50:153-60.
- Ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. Odontol 2006;94:1-9.
- Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K *et al*. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. J Endod 2014;40:670–7.
- Tote K, Horemans T, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl Environ Microbiol 2010;76:3135–42.
- Vengerfeldt V, Spilka K, Saag M, Preem JK, Oopkaup K, Truu J *et al*. Highly diverse microbiota in dental root canals in cases of apical periodontitis (data of illumina sequencing). J Endod 2014;40:1778–83.
- Vieira DB, Carmona-Ribeiro AM. Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. J Antimicrob Chemother 2006; 58:760-7.
- Vittal R, Gomathi H, Kim KJ. Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes. Adv Colloid Interface Sci 2006; 31:55-68.
- Wade WG. The oral microbiome in health and disease. Pharmacol Res 2013;69:137-43.
- Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. J Endod 2005;31:863–6.
- Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. J Endod 2012; 38:948-53.
- Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis* infected dentin. J Endod 2013;39:1395-400.
- Wang Z, de la Fuente-Núñez C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock RE. Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an Anti-Biofilm Peptide. PLoS One 2015;10:132512.
- Watson SP, Clements MO, Foster SJ. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1998;180:1750–8.
- Watters C, Everett JA, Haley C, Clinton A, Rumbaugh KP. Insulin treatment modulates the host immune system to enhance *Pseudomonas aeruginosa* wound biofilms. Infect Immun 2014;82:92-100.
- Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. J Endod 2003;29:562-4.
- White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod 1997;23:229–31.
- Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. J Endod 2009;35:95–7.
- Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. J Dent Res 2000;79:21–7.
- Yanai R, Ueda K, Nishida T, Toyohara M, Mori O. Effects of tonicity-adjusting and surfactant agents on the antimicrobial activity of alexidine. Eye Contact Lens 2011;37:57-60.
- Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J *et al*. Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions. J Endod 2016;42:1246-50.
- Yao CS, Waterfield JD, Shen Y, Haapasalo M, Macentee MI. *In vitro* antibacterial effect of carbamide peroxide on oral biofilm. J Oral Microbiol 2013;5:10.3402.
- Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. J Endod 1995;21:513-5.

- Zaura-Arite E, Van Marle J, Ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001;80:1436–40.
- Zapata RO, Bramante CM, de Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MS, *et al.* Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. *J Endod* 2008;34:1198–
- Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2009; 35:1051-5.
- Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. *J Endod* 2015;41:1207–13.
- Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94:756–62.
- Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-98.
- Zehnder M, Belibasakis GN. On the dynamics of root canal infections—what we understand and what we don't. *Virulence* 2015;6:216-222.
- Zhu X, Wang Q, Zhang C, *et al.* Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:1950–5.
- Zoletti GO, Siqueira JFJr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod* 2006;32:722–6.
- Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:730–7.

Anexos

Los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral han sido publicados e informados previamente a la siguiente revista científica:

Publicación:

- Autor: Ruíz-Linares M, Aguado-Pérez B, Baca P, Arias-Molíz MT, Ferrer-Luque CM. Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. International of Endodontics Journal 2017;50:77-83.