

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Microbiología



**EFFECTO DE LOS DETRITOS DE DENTINA Y BARRILLO
DENTINARIO EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
SOLUCIONES DE HIPOCLORITO SÓDICO**

*Effect of dentine debris and dentine smear layer on the
antimicrobial activity of sodium hypochlorite solutions*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR CON MENCIÓN INTERNACIONAL,
PRESENTADA POR

ANA YOLANDA MORAGO GUARDIA

PROGRAMA DE DOCTORADO: MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA

Granada, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ana Yolanda Morago Guardia
ISBN: 978-84-1306-221-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/56017>

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada durante los años 2015-2019, dentro del Grupo de Investigación “Microbiología, Inmunología, Epidemiología y Prevención de las Enfermedades Bucodentales” CTS 167.

Durante el desarrollo de este trabajo, la doctoranda ha disfrutado de una beca de movilidad internacional gracias al ‘Centro de Promoción de Empleo y Prácticas’ de la Universidad de Granada, en el curso académico 2016/2017. La estancia de 3 meses de duración, se realizó en los laboratorios de investigación de la Facultad de Odontología (*School of Dentistry*) de la Universidad de Cardiff (Cardiff, Gales, Reino Unido). El trabajo realizado perteneció al tema de investigación ‘Ciencias Orales y Biomédicas’ (*Oral and Biomedical Sciences*), bajo la supervisión del Profesor David Williams.

AGRADECIMIENTOS

Realizar esta tesis doctoral ha sido un largo camino, con momentos frustrantes y otros estimulantes. Un camino en el que he aprendido mucho y he podido vivir nuevos retos y experiencias, siempre rodeada de personas que me han apoyado y ayudado, a las que me gustaría dar las gracias.

En primer lugar, quiero agradecer enormemente a mi directora, Teresa Arias Moliz, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su supervisión. He aprendido mucho trabajando contigo, desde constancia y esfuerzo hasta conceptos de Odontología que nunca imaginé que aprendería y utilizaría. Gracias por el ánimo, ayuda y apoyo incondicional que me has brindado desde que nos conocimos, tanto en el ámbito profesional como personal.

A mi directora Matilde Ruiz Linares, por tener siempre unas palabras de aliento y ánimo que me hicieran seguir adelante, por su disponibilidad y orientación.

Al personal técnico de laboratorio, que con su trabajo han ayudado a que esta investigación haya terminado con éxito. Quiero agradecer en especial a Francisca Castillo Pérez y Yudi Gómez Villaescusa, con las que he compartido muchas horas y siempre han estado al pie del cañón, listas para ayudarme y colaborar en lo que hiciera falta, además de brindarme su cariño. También quiero agradecer a Ana Santos Carro y Rocío Márquez Crespo por su asesoramiento y ayuda técnica con el microscopio. A Beatriz Aguado Pérez por su cercanía y ayuda, y a Sofía Tejada Magraner por su amistad y por compartir conmigo parte de este camino.

Agradecer al 'Centro de Promoción de Empleo y Prácticas' de la Universidad de Granada por darme la oportunidad de realizar una estancia en el extranjero donde pude crecer profesional y personalmente. Gracias al Profesor David Williams por darme la oportunidad de trabajar en su equipo, por su recibimiento, confianza, cercanía y amabilidad, por poner a mi alcance cualquier oportunidad de aprendizaje y por estar siempre dispuesto a ayudarme. A mi compañero Daniel Morse, que fue mi guía tanto en el laboratorio como en los alrededores, por su paciencia y humor con el idioma y por los '*coffee chats*' en la oficina. Muchísimas gracias a ambos por vuestra amistad, por darme a conocer vuestra cultura y vuestro país, y por hacer de esos meses una experiencia enriquecedora e inolvidable.

A mi familia por su apoyo incondicional, pero sobretodo, deseo agradecer infinitamente a mis padres, que con su esfuerzo han hecho posible que yo haya podido llegar hasta aquí. Gracias por vuestra paciencia y confianza, por apoyarme en todo momento y animarme a perseguir mis metas, las pasadas y las que están por venir.

A mi otra familia. A Julia y Noelia, por entenderme tan bien y tener palabras de apoyo y aliento en todo momento; a Álex, Alicia, Antonio e Irene por darme ánimos y poner siempre un toque de humor; y a Jose por su positividad, por tener siempre unas palabras de ánimo y darme fuerza. Gracias por creer en mí aunque sólo hayas vivido la última etapa de este camino.

En definitiva, gracias a todos aquellos que de cualquier forma se cruzaron en este proceso y me animaron, ayudaron o facilitaron de algún modo la realización de esta tesis doctoral.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	11
1.1. INFECCIÓN ENDODÓNTICA	13
1.2. ENTEROCOCCUS Y BIOPELÍCULAS	15
1.2.1. Género <i>Enterococcus</i>	15
1.2.2. <i>Enterococcus</i> en infecciones endodónticas.....	15
1.2.3. Crecimiento de biopelículas en el interior del sistema de conductos radiculares	18
1.3. TRATAMIENTO ENDODÓNTICO	22
1.3.1. Barrillo dentinario y detritus de dentina	23
1.3.2. Soluciones irrigadoras	25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1. MATERIAL	37
3.1.1. Cepa bacteriana y medios de cultivo	37
3.1.2. Soluciones irrigadoras	37
3.1.3. Obtención del polvo de dentina.....	38
3.2. MÉTODOS	40
3.2.1. Influencia de los detritus de dentina en la actividad antimicrobiana de soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP	40
3.2.1.1. Determinación del cloro libre.....	40
3.2.1.2. Determinación del pH.....	41
3.2.1.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana frente a biopelículas de <i>E. faecalis</i> ...	41
3.2.1.4. Evaluación <i>ex vivo</i> de la actividad antimicrobiana de las soluciones frente a biopelículas de <i>E. faecalis</i> sobre superficies de dentina	45
3.2.2. Evaluación <i>ex vivo</i> de la influencia del barrillo dentinario en la actividad antimicrobiana de soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP	49
3.2.2.1. Evaluación <i>ex vivo</i> de la influencia del barrillo dentinario en la actividad antimicrobiana de las soluciones frente a <i>E. faecalis</i> en el interior de los túbulos dentinarios	49
3.2.2.2. Determinación <i>ex vivo</i> de la capacidad de las soluciones para eliminar el barrillo dentinario	52

3.2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana y de eliminar barrillo dentinario de distintos protocolos de irrigación durante la preparación químico-mecánica.....	52
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
3.3.1. Evaluación de la capacidad de las soluciones para eliminar biopelículas crecidas sobre superficies de dentina.....	56
3.3.2. Evaluación de la capacidad de las soluciones para eliminar biopelículas crecidas en el interior de los túbulos dentinarios.....	56
3.3.3. Evaluación de la capacidad de las soluciones para eliminar biopelículas y barrillo dentinario de los protocolos de irrigación en el interior de los túbulos dentarios durante la preparación del conducto radicular.....	57
RESULTADOS.....	59
4.1. VALIDACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA Y LA CAPA DE BARRILLO DENTINARIO.....	61
4.2. INFLUENCIA DE LOS DETRITOS DE DENTINA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SOLUCIONES DE NACLO SOLAS Y COMBINADAS CON HEBP.....	62
4.2.1. Determinación del cloro libre.....	62
4.2.2. Determinación del pH.....	63
4.2.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana frente a biopelículas de <i>E. faecalis</i>	64
4.2.4. Evaluación <i>ex vitro</i> de la actividad antimicrobiana de las soluciones frente a biopelículas de <i>E. faecalis</i> sobre superficies de dentina.....	64
4.3. EVALUACIÓN EX VIVO DE LA INFLUENCIA DEL BARRILLO DENTINARIO EN LA ACTIVIDAD DE LAS SOLUCIONES DE NACLO SOLAS Y COMBINADAS CON HEBP.....	68
4.3.1. Evaluación <i>ex vitro</i> de la influencia del barrillo dentinario en la actividad antimicrobiana de las soluciones frente a <i>E. faecalis</i> en el interior de los túbulos dentinarios.....	68
4.3.2. Determinación <i>ex vivo</i> de la capacidad de las soluciones para eliminar barrillo dentinario....	70
4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y DE ELIMINAR EL BARRILLO DENTINARIO DE DISTINTOS PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN DURANTE LA PREPARACIÓN QUÍMICO-MECÁNICA.....	71
DISCUSIÓN.....	75
5.1. VALIDEZ INTERNA DEL ESTUDIO.....	77
5.2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS DETRITOS DE DENTINA EN EL CLORO LIBRE, PH Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO Y EX VIVO DE SOLUCIONES.....	83
5.3. ESTUDIO EX VIVO DE LA INFLUENCIA DEL BARRILLO DENTINARIO EN LA ACTIVIDAD DE SOLUCIONES DE NACLO SOLAS Y COMBINADAS CON HEBP.....	86
5.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ELIMINACIÓN DE BARRILLO DENTINARIO DE DISTINTOS PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN DURANTE LA PREPARACIÓN QUÍMICO-MECÁNICA.....	89
CONCLUSIONES.....	93

CONCLUSIONS	97
ANEXOS	101
1. PUBLICACIONES DE ESTA TESIS DOCTORAL	103
2. INDICIOS DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES / <i>JOURNAL CITATION REPORT (JCR)</i>	105

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

Los objetivos de esta tesis fueron determinar la influencia del polvo de dentina en la concentración, pH y actividad antimicrobiana de la solución de hipoclorito de sodio (NaClO) sola y combinada con ácido etidróico (HEBP) (Objetivo 1), evaluar la influencia del barrillo dentinario sobre la actividad antimicrobiana de NaClO combinado con HEBP frente a bacterias crecidas en el interior de los túbulos dentinarios (Objetivo 2) y analizar la actividad antimicrobiana y de eliminación de barrillo dentinario de diferentes protocolos de irrigación —NaClO, NaClO seguido de EDTA y NaClO combinado con HEBP— en túbulos dentinarios infectados, durante la preparación del conducto radicular (Objetivo 3).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para llevar a cabo el Objetivo 1, se formaron biopelículas de *Enterococcus faecalis* sobre la superficie de bloques de dentina durante 5 días y, posteriormente, se expusieron a soluciones de NaClO al 1% y 2,5% solas y combinadas con HEBP al 9% durante 3 minutos, en ausencia y presencia de polvo de dentina. Tras la exposición, los biovolúmenes bacterianos fueron medidos utilizando la microscopía láser confocal (MLC) y la técnica *live/dead*. El cloro disponible y el pH de las soluciones también se midieron a lo largo del tiempo. Se usaron tests no paramétricos para determinar diferencias estadísticas ($p < 0,05$).

Para lograr el Objetivo 2, se prepararon bloques de dentina radicular cuyos túbulos dentinarios se infectaron con *E. faecalis* mediante centrifugación. Después de 5 días de incubación, las muestras se dividieron en dos grupos, con y sin barrillo dentinario. Éstas se trataron con NaClO al 2,5% solo y en combinación con HEBP al 9%, durante 3 minutos. El porcentaje de células muertas en los túbulos dentinarios infectados se midió utilizando MLC, así como la técnica *live/dead*. La capa de barrillo dentinario de la superficie de la pared del conducto radicular se observó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Los resultados del porcentaje de células muertas se compararon mediante pruebas paramétricas ($p < 0,05$) después de someter los datos a la transformación normalizada de Anscombe. Finalmente, para alcanzar el Objetivo 3 se emplearon raíces unirradiculares cuyos túbulos dentinarios se contaminaron con *E. faecalis*. Las raíces se dividieron en los siguientes grupos en función de los protocolos de irrigación: 1) agua destilada durante y después de la instrumentación; 2) NaClO al 2,5% durante y después de la instrumentación; 3) NaClO al 2,5%/HEBP al 9% durante y después de la instrumentación; 4) NaClO al 2,5% durante la instrumentación, seguido de 17% EDTA después de la

instrumentación. El porcentaje de células muertas y el biovolumen en los túbulos dentinarios infectados, se midió utilizando MLCy la técnica *live/dead*. La eliminación de la capa de barrillo dentinario en la superficie de la pared del conducto radicular se observó mediante MEB. Los resultados se compararon mediante pruebas paramétricas ($p < 0,05$).

RESULTADOS:

En el estudio 1, la presencia de polvo de dentina redujo el cloro libre disponible y el pH en todas las soluciones a lo largo del tiempo. El NaClO al 1% perdió su actividad antimicrobiana completamente en presencia de polvo de dentina. La actividad antimicrobiana se redujo significativamente en los grupos con NaClO al 2,5% y NaClO al 1%/HEBP al 9%, y no se vio afectada en el grupo de NaClO al 2,5%/HEBP al 9%.

En el estudio 2, en ausencia de barrillo dentinario, NaClO al 2,5% solo y combinado con HEBP al 9% mostró una actividad antimicrobiana alta sin diferencias significativas entre los dos grupos. Por el contrario, la capa de barrillo dentinario redujo significativamente la actividad antimicrobiana del NaClO al 2,5%, mientras que la solución con HEBP no se vio afectada. No se obtuvieron túbulos dentinarios libres de barrillo en el grupo de NaClO al 2,5%. En el caso del grupo tratado con NaClO al 2,5%/HEBP al 9%, el 95,40% \pm 3,63 de los túbulos dentinarios estaban libres de barrillo.

Finalmente, en el estudio 3, los grupos NaClO, NaClO/HEBP y NaClO + EDTA ejercieron la mayor actividad antimicrobiana ($p < 0,05$), seguido del grupo irrigado con agua. Todos los protocolos de irrigación, incluida el agua, redujeron significativamente el biovolumen. No se encontraron túbulos dentinarios libres de barrillo en el control positivo o en el grupo NaClO al 2,5%. Cuando se emplearon NaClO/HEBP y NaClO + EDTA, el 90,41% \pm 7,33 y el 76,54% \pm 15,30, respectivamente, de los túbulos dentinarios estaban libres de barrillo ($p = 0,01$).

CONCLUSIONES:

1. La presencia de polvo de dentina disminuyó significativamente el cloro disponible y la actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras de NaClO al 1% y 2,5% y NaClO al 1% combinado con HEBP al 9%. Sin embargo, la actividad antimicrobiana del NaClO al 2,5%/HEBP al 9% no se vio afectada por el polvo de dentina después de 3 minutos de contacto frente a biopelículas de *E. faecalis*.

2. La capa de barrillo dentinario redujo la actividad antimicrobiana de NaClO al 2,5%. En cambio, la combinación de NaClO al 2,5%/HEBP al 9% ejerció una importante actividad antimicrobiana que no se redujo por el barrillo dentinario.

3. Durante la preparación químico-mecánica, NaClO/HEBP y NaClO + EDTA ejercieron una importante actividad antimicrobiana frente a las bacterias del interior de los túbulos dentinarios, disminuyendo el biovolumen de bacterias y eliminando una gran cantidad de barrillo, especialmente en el grupo NaClO/HEBP.

PALABRAS CLAVE: Actividad antimicrobiana; detritus de dentina; barrillo dentinario; ácido etidróico; hipoclorito de sodio; soluciones irrigadoras; dentina infectada; desinfección de túbulos dentinarios.

ABSTRACT

INTRODUCTION:

The aims of this thesis were to determine the influence of dentin powder on the concentration, pH and antimicrobial activity of sodium hypochlorite (NaOCl) alone and combined with etidronic acid (HEBP) (Objective 1), to evaluate the influence of the smear layer on the antimicrobial activity of a 2.5% NaOCl/9% HEBP irrigating solution against bacteria growing inside dentin tubules (Objective 2) and to test the antimicrobial activity and the smear layer removal of different irrigation protocols —NaOCl, NaOCl followed by EDTA, and NaOCl combined with HEBP— against infected dentine tubules during root canal preparation (Objective 3).

MATERIAL AND METHODS:

To carry out the Objective 1, biofilms of *Enterococcus faecalis* were grown on the surface of dentin blocks for 5 days and then exposed to 1% and 2.5% NaOCl alone or combined with 9% HEBP for 3 minutes in the absence and presence of dentin powder. The biovolumes of the biofilm were measured using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and the live/dead technique. The available chlorine and pH of the solutions were also measured. Non-parametric tests were used to determine statistical differences ($p < 0.05$).

To perform the Objective 2, dentin tubules were infected with *Enterococcus faecalis* by centrifugation. After 5 days of incubation, smear layer was formed in half of the samples and they were then all treated with 2.5% NaOCl either alone or combined with 9% HEBP for 3 minutes. The percentage of dead cells in infected dentinal tubules was measured by using CLSM as well as the live/dead technique. The smear layer on the surface of the root canal wall was also observed by scanning electron microscopy (SEM). Results of the percentage of dead cells were compared using parametric tests after subjecting data to the normalized Anscombe transformation. The level of significance was $p < 0.05$.

Finally, to reach Objective 3, single rooted premolars contaminated with *Enterococcus faecalis* were chemomechanically prepared. Depending on the irrigation protocols, the roots were divided into the following groups: 1) distilled water during and after instrumentation; 2) 2.5% NaOCl during and after instrumentation; 3) 2.5% NaOCl/9% HEBP during and after instrumentation; and 4) 2.5% NaOCl during instrumentation followed by 17% EDTA after instrumentation. The percentage of dead cells and the biovolume in infected dentine tubules were measured by using CLSM and the live/dead technique. Smear layer removal on root canal wall surfaces was observed by means of SEM. Results were compared through parametric tests ($p < 0.05$).

RESULTS:

In the study 1, the presence of dentin powder resulted in a reduction of the free available chlorine and pH in all the irrigating solutions. The 1% NaOCl lost its antimicrobial activity completely in the presence of dentin powder. The antimicrobial activity was significantly reduced in groups 2.5% NaOCl and 1% NaOCl/HEBP, and it was not affected in the 2.5% NaOCl/HEBP group.

In the study 2, in the absence of smear layer, 2.5% NaOCl alone and combined with 9% HEBP showed high antimicrobial activity without significant differences between the two groups. Smear layer reduced the antimicrobial activity of 2.5% NaOCl significantly, whereas the solution with HEBP was not affected. No dentin tubules free of smear layer were obtained in the 2.5% NaOCl group. In the case of 2.5% NaOCl/9% HEBP, 95.40% \pm 3.63 of dentin tubules were cleaned.

Finally, in the study 3, the groups NaOCl, NaOCl/HEBP and NaOCl+EDTA exerted the highest antimicrobial activity ($p > 0.05$) followed by the group irrigated with water. All the irrigation protocols—including water—significantly reduced the bacteria biovolume. No dentine tubules free of smear layer were found in the positive control or the 2.5% NaOCl group. With NaOCl/HEBP and NaOCl+EDTA, respectively, 90.41% \pm 7.33 and 76.54% \pm 15.30 of dentine tubules were free of smear layer ($p = 0.01$).

CONCLUSIONS:

1. The presence of dentin powder significantly decreased the available chlorine and antimicrobial activity of 1% NaOCl, 2.5% NaOCl and 1% NaOCl/9% HEBP irrigating solutions. However, the antimicrobial activity of 2.5% NaOCl/9% HEBP was not affected by the dentin powder after 3 minutes contact time against *E. faecalis* biofilms.
2. The smear layer reduced the antimicrobial activity of 2.5% NaOCl. The combination of 2.5% NaOCl/9% HEBP exerted antimicrobial activity that was not reduced by the smear layer.
3. Under the chemo-mechanical preparation, the NaOCl/HEBP and NaOCl+EDTA exerted an important antimicrobial activity against bacteria inside dentine tubules, lowering the bacteria biovolume and eliminating a high amount of the smear layer, particularly in the NaOCl/HEBP group.

KEYWORDS: Antimicrobial activity; dentin debris; smear layer; etidronic acid; sodium hypochlorite; root canal irrigants; infected dentin; dentine tubule disinfection.

INTRODUCCIÓN

1.1. INFECCIÓN ENDODÓNTICA

La infección endodóntica es aquella patología que tiene lugar en el tejido pulpar y periapical. La pulpa es un tejido conectivo, un paquete vasculonervioso albergado en la cavidad pulpar que está ubicada, a su vez, en el interior del diente. La cavidad pulpar está delimitada en toda su longitud por dentina, que es un tejido altamente mineralizado formado por 70% de materia inorgánica (cristales de fosfato cálcico, principalmente hidroxiapatita, pero también pequeñas cantidades de magnesio, sodio, cloruro, potasio, carbonato y fluoruro, entre otros), un 20% de materia orgánica (mayormente colágeno tipo I, pero también proteínas no colágenas) y un 10% de agua¹. La dentina se extiende entre el esmalte o cemento y la pulpa, y tiene una estructura tubular ya que la atraviesan túbulos dentinarios en cuyo interior se encuentran los odontoblastos. La pulpa y la dentina forman un complejo estructural-funcional que está protegido de la cavidad oral mediante los tejidos duros dentarios, el esmalte y el cemento². A su vez, la pulpa está conectada con los tejidos periapicales, hueso alveolar y ligamento periodontal, a través de un orificio conocido como foramen apical. Esta es la razón por la que las infecciones pulpares progresan hacia los tejidos periapicales.

Los microorganismos constituyen un factor etiológico fundamental en el desarrollo y progresión de la enfermedad pulpar y periapical^{3,4}. Si bien éstos participan en muchas relaciones beneficiosas, se comportan como patógenos oportunistas cuando acceden a una zona del organismo normalmente libre de agentes microbianos, como ocurre en la pulpa dental. La pérdida de la integridad de los tejidos que protegen a la pulpa como ocurre en las lesiones de caries, tratamientos periodontales, fracturas o traumatismos dentarios^{5,6}, favorece la invasión microbiana de la pulpa originando una infección endodóntica primaria. Dicha infección tiene un carácter polimicrobiano y mixto^{7,8}. Las infecciones endodónticas secundarias son aquellas que se originan por la persistencia de microorganismos y/o la filtración coronapical tras realizar el

¹ Jenkins G. The physiology and biochemistry of the mouth, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1978.

² Gómez ME, Campos A. Complejo dentino-pulpar II: Dentina. En: Histología y Embriología Bucodental. Ed Médica Panamericana, 1999:195-225.

³ 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.

⁴ Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. Odontol Revy 1974;25:347-58.

⁵ Love RM. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. Endod Dent Traumatol 1996;12:289-93.

⁶ Haapasalo M, Udnæs T, Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. Endodontic Topics 2003;6:29-56.

⁷ 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.

⁸ Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res 2002;81:761-6.

tratamiento endodóntico y da lugar al fracaso de dicho tratamiento. El factor decisivo que influye, por tanto, en el éxito del tratamiento a largo plazo es la persistencia de microorganismos dentro del sistema de conductos^{9,10,11,12,13} o la llegada de nuevos microorganismos, ya que representan un riesgo latente para que el tratamiento fracase y se perpetúe la inflamación de los tejidos periapicales^{14,15}. Los microorganismos persistentes suelen ser anaerobios facultativos y muestran una escasa actividad metabólica debido a la escasez de nutrientes del conducto radicular tratado. Esto les hace más resistentes tanto a las nuevas condiciones presentes como al tratamiento y agentes desinfectantes^{16,17}. Por otro lado, estos microorganismos generalmente se encuentran en áreas a las que los instrumentos y sustancias antimicrobianas que se emplean durante el tratamiento no pueden acceder, como son los canales laterales, las ramificaciones y los istmos^{18,19,20,21}, incluso en las paredes del conducto radicular a las que los instrumentos no llegaron^{22,23,24,25}.

⁹ 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.

¹⁰ 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.

¹¹ Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16:498-504.

¹² Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580-8.

¹³ Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:281-93.

¹⁴ Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16:498-504.

¹⁵ Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34:1-10.

¹⁶ Haapasalo M, Udnæs T, Endal U. Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endodontic Topics* 2003;6:29-56.

¹⁷ Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:128-37.

¹⁸ Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:231-52.

¹⁹ Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580-8.

²⁰ Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod* 2009;35:493-502.

²¹ 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.

²² Paqué F, Balmer M, Attin T, Peters OA. Preparation of oval-shaped root canals in mandibular molars using nickel-titanium rotary instruments: a micro-computed tomography study. *J Endod* 2010;36:703-7.

²³ Peters OA, Sch€onenberger 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.

²⁴ Versiani MA, Pecora JD, de Sousa-Neto MD. Flat-oval root canal preparation with self-adjusting file instrument: a micro-computed tomography study. *J Endod* 2011;37:1002-7.

²⁵ Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rˆocas IN, Siqueira JF Jr. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod* 2011;37:496-501.

1.2. ENTEROCOCCUS Y BIOPELÍCULAS

1.2.1. GÉNERO *ENTEROCOCCUS*

Como previamente se ha mencionado, las infecciones endodónticas tienen un carácter polimicrobiano y mixto. Uno de los microorganismos que se aísla con más frecuencia es *Enterococcus faecalis*.

Los enterococos son cocos Gram-positivos que se visualizan como células aisladas, en parejas o en cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, ya que, aunque carecen de catalasa, poseen superóxido dismutasa y peroxidasa que eliminan el O_2^- y el H_2O_2 , respectivamente, que se generan en condiciones de aerobiosis²⁶. Catabolizan una gran variedad de fuentes energéticas incluyendo carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina, y α -ceto ácidos²⁷. Sobreviven en condiciones ambientales muy adversas, de modo que soportan niveles de pH de 9,6 así como elevadas concentraciones de cloruro sódico²⁸. Son resistentes a sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, azida y a la desecación²⁹. Crecen entre 10 y 45°C y sobreviven a 60°C durante 30 minutos³⁰. Los enterococos se encuentran habitualmente entre los tres principales patógenos bacterianos implicados en infecciones nosocomiales³¹. Son comensales del tracto gastrointestinal y vagina.

1.2.2. *ENTEROCOCCUS* EN INFECCIONES ENDODÓNTICAS

Los enterococos se consideran microbiota transitoria de la cavidad oral ya que raramente se aíslan en personas que presentan salud bucal. La principal vía de entrada de los enterococos a la cavidad oral parece ser la comida, concretamente a través de productos lácteos, carnes, vegetales y aceitunas^{32,33}. Habitualmente son eliminados por la microbiota normal oral, sin

²⁶ Piard JC, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. I. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Lait 1992;71:525-41.

²⁷ 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.

²⁸ Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cell Mol Life Sci 2003;60:2622-36.

²⁹ 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.

³⁰ Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cell Mol Life Sci 2003;60:2622-36.

³¹ Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. Infect Control Hosp Epidemiol 2000;21:510-5.

³² Al-Ahmad A, Maier J, Follo M, Spitzmüller B, Wittmer A, Hellwig E, Hübner J, Jonas D. Food-borne enterococci integrate into oral biofilm: an in vivo study. J Endod 2010;36:1812-9.

embargo, pueden acceder a los conductos radiculares a través de lesiones de caries profundas y restauraciones débilmente selladas e inducir y mantener la lesión endodóntica.

Los conductos radiculares necróticos o deficientemente obturados constituyen un hábitat ideal para *Enterococcus*, especialmente para *E. faecalis*. Su prevalencia es mayor en infecciones endodónticas secundarias o persistentes (24-77%) que en infecciones primarias (4-40%)^{34,35,36,37,38,39,40,41,42}. Algunos trabajos han hallado a los enterococos en monoinfección, particularmente a *E. faecalis*^{43,44,45,46,47,48} que ha sido encontrado en conductos radiculares con lesiones periapicales persistentes en un 40-70%^{49,50,51,52,53,54}. Esto se debe a que posee una

³³ Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzappel WH. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 2003;88:105-22.

³⁴ Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

³⁵ Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.

³⁶ Sundqvist G, Fidgor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.

³⁷ Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000;26:593-5.

³⁸ Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34:429-34.

³⁹ Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:579-86.

⁴⁰ Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.

⁴¹ Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-3.

⁴² Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.

⁴³ Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996;29:235-41.

⁴⁴ Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997;30:91-5.

⁴⁵ Sundqvist G, Fidgor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.

⁴⁶ Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:309-12.

⁴⁷ Ferrari PH, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2005;38:372-80.

⁴⁸ Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.

⁴⁹ Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.

⁵⁰ Sundqvist G, Fidgor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.

⁵¹ Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:309-12.

⁵² Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34:429-34.

⁵³ Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-3.

amplia variedad de factores de virulencia, entre los que se incluyen: enzimas líticos, citolisina, sustancias de agregación y ácidos lipoteicoicos⁵⁵. Es un patógeno oportunista implicado en la persistencia de la infección que puede adherirse a las células del hospedador y expresar proteínas que compiten con otras células alterando la respuesta del mismo^{56,57}. Además, *E. faecalis* es capaz de provocar inhibición linfocitaria lo cual contribuye potencialmente al fracaso del tratamiento de conductos⁵⁸. Sin embargo, la resistencia de esta bacteria no depende tanto de sus factores de virulencia como de su capacidad para sobrevivir y persistir como patógeno en el interior de los conductos radiculares⁵⁹, lo que consigue por diversos motivos:

- Presenta una amplia variedad de polimorfismos genéticos⁶⁰.
- Produce gelatinasa y proteína de unión al colágeno (Ace) que le ayuda a unirse a la dentina⁶¹.
- Su tamaño es lo suficientemente pequeño como para invadir y vivir en los túbulos dentinarios⁶².
- Puede subsistir largas temporadas de escasez de nutrientes y utilizar el suero como fuente de alimento⁶³. Además, el suero procedente del espacio periapical le sirve de ayuda para unirse al colágeno tipo I⁶⁴.
- Resiste a la medicación intraconducto con hidróxido de calcio durante más de 10 días en el interior de los túbulos^{65,66,67}.

⁵⁴ Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.

⁵⁵ Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

⁵⁶ Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

⁵⁷ Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.

⁵⁸ Lee W, Lim S, Son HH, Bae KS. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004;30:209-12.

⁵⁹ Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

⁶⁰ Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:95-101.

⁶¹ Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:121-6.

⁶² Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.

⁶³ Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234-9.

⁶⁴ Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.

⁶⁵ Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142-9.

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

⁶⁷ Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221-8.

- Crece formando biopelículas siendo más resistentes a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos que cuando crece en forma planctónica⁶⁸.

1.2.3. CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS EN EL INTERIOR DEL SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES

Posiblemente la primera observación de biopelículas en conductos infectados se deba a Nair⁶⁹. En sus estudios se examinó el interior de conductos radiculares de dientes con infección endodóntica mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), y observó agregados densos de microorganismos adheridos a las paredes del conducto. Los espacios entre los microorganismos estaban rellenos de un material amorfo que fue interpretado como una matriz extracelular de origen bacteriano.

En la actualidad está bien establecido que el estilo de vida bacteriano más común en los ambientes naturales es aquel en que las bacterias se adhieren a una superficie formando una estructura conocida como biopelícula^{70,71}. De hecho, se considera que las bacterias que no se encuentren formando parte de una biopelícula, constituyen la fase inicial de la formación de otra en una nueva superficie⁷². Por lo tanto, podemos hablar de biopelícula o *biofilm*, como una estructura compleja formada por agregados celulares y huecos intersticiales, adherida a un material o interfase que puede ser de naturaleza abiótica o biótica. Los microorganismos que componen la biopelícula están unidos por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, *Extracellular Polymeric Substance*) que son producidas y excretadas por ellos mismos⁷³. Está formada por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, aunque también puede contener componentes del huésped⁷⁴ como, por ejemplo, de la saliva. La matriz de EPS es el principal agente estructural de las biopelículas. Entre sus funciones se encuentran permitir, establecer y mantener asociaciones entre microorganismos y entre éstos y su medio ambiente, constituye un reservorio de energía y carbono^{75,76} y actúa como protección frente a la

⁶⁸ Distel J, Hatton J, Gillespie J. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28:689-93.

⁶⁹ Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987;13:29-39.

⁷⁰ Decho, A. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 2000;20:1257-73.

⁷¹ Danese P, Pratt L, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 2000;182:3593-6.

⁷² Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000;182:2675-9.

⁷³ Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-22.

⁷⁴ Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Høiby N, Moser C, Costerton JW, Møller A, Bjarnsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;65:127-45.

⁷⁵ Decho, A. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 2000;20:1257-73.

⁷⁶ Liu H, Herbert HP, Fang HP. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J Biotechnol* 2002;95:249-56.

deseccación, manteniendo un ambiente adecuado para la supervivencia^{77,78,79,80,81}. Por otro lado, los EPS pueden unirse activamente a los agentes antimicrobianos, ralentizando y limitando así su penetración en la biopelícula. Ésto hace que reduzcan la concentración efectiva de la sustancia antibacteriana que llega a las células de la biopelícula⁸².

La formación de la biopelícula comienza con la adhesión de bacterias planctónicas a una superficie, como puede ser la superficie dentaria en la cavidad oral. La adhesión inicial es reversible. Este estado pasa a ser irreversible cuando se produce la interacción entre las adhesinas de la superficie de los colonizadores primarios y los receptores específicos de la superficie dentaria. El desarrollo de la biopelícula continúa con la formación de microcolonias mediante el crecimiento y adhesión de otras bacterias a la biopelícula, aumentando la densidad celular⁸³ y generando una estructura cada vez más madura y compleja. Este crecimiento celular activa una vía de comunicación intercelular mediante la liberación, por parte de las bacterias, de moléculas de señalización. Esta comunicación se denomina *quorum sensing*^{84,85,86} y da lugar a una biopelícula con capacidad de comunicarse entre sí y de regular los procesos metabólicos⁸⁷. El *quorum sensing* permite la regulación coordinada de la expresión de proteínas clave en las biopelículas, así como la activación de una respuesta sincronizada en toda su población, lo que mejora la supervivencia de la misma⁸⁸. Por tanto, la biopelícula madura está compuesta por una infinidad de microcolonias recubiertas por la matriz de EPS y separadas unas de otras por canales de fluido que crean un sistema de comunicación entre las células, permitiendo el flujo de nutrientes, oxígeno, metabolitos, enzimas y moléculas de señalización, así como la eliminación de productos de desecho⁸⁹.

⁷⁷ Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 1998;9:54-85.

⁷⁸ Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318-22.

⁷⁹ Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. Endod Topics 2004;9:27-36.

⁸⁰ Clinton A, Carter T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. Lab Med 2015;46:277-84.

⁸¹ Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 2001;147:3-9.

⁸² Kreth J, Herzberg MC. Molecular Principles of Adhesion and Biofilm Formation. In: Chávez de Paz L, Sedgley C, Kishen A (eds). The Root Canal Biofilm. Springer Series on Biofilms, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg; 2015.

⁸³ 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.

⁸⁴ Struzycka I. The Oral Microbiome in Dental Caries. Polish J Microbiol 2014;63:127-35.

⁸⁵ Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends Microbiol 2005;13:27-33.

⁸⁶ Keller L, Surette MG. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol 2006;4:249-58.

⁸⁷ Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. J Endod 2007;33:652-62.

⁸⁸ Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends Microbiol 2005;13:27-33

⁸⁹ Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. J Bacteriol 1991;173:6558-67.

Finalmente, algunas bacterias que forman parte de la biopelícula se separan de la misma quedando libres. Así colonizarán otras superficies con el fin de formar nuevas biopelículas, repitiendo el ciclo de formación y desarrollo antes mencionado (**Figura 1.1.**). Por tanto, esta agrupación de bacterias es un mecanismo de adaptación frente a entornos nuevos u hostiles^{90,91} siendo las biopelículas orales hábitats bacterianos con complejas interacciones hospedador-biopelícula.

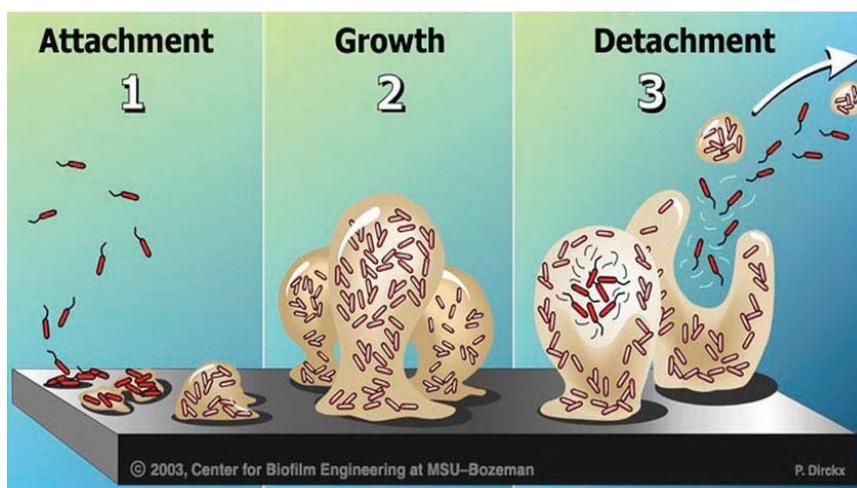


Figura 1.1. Esquema de la formación y maduración de una biopelícula. **1:** Adhesión (attachment); **2:** Maduración (Growth) y **3:** Dispersión (detachment). Imagen tomada de *Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, MT*.

Las bacterias que forman parte de las biopelículas generalmente tienen una baja tasa metabólica y, como se ha mencionado, son considerablemente más resistentes a agentes tóxicos^{92,93} que cuando se presentan como células individuales o aisladas. Esto es debido principalmente a diversos factores:

1. La matriz es una barrera física que impide la difusión de agentes tóxicos⁹⁴ y también provee de protección frente a células inmunitarias del hospedador⁹⁵.

⁹⁰ O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79.

⁹¹ 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.

⁹² Stewart PS, Rayner J, Roe F, Rees WM. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol* 2001;91:525-32.

⁹³ Tachikawa M, Tezuka M, Morita M, Isogai K, Okada S. Evaluation of some halogen biocides using a microbial biofilm system. *Water Res* 2005;39:4126-32.

⁹⁴ Stewart PS, Grab L, Diemer JA. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. *J Appl Microbiol* 1998;85:495-500.

2. El número de bacterias concentradas en una biopelícula es muy alto y ofrece la posibilidad de liberar enzimas en concentraciones mayores; estas enzimas serían las responsables de modificar los agentes antimicrobianos y transformarlos a formas no tóxicas.
3. Desde el punto de vista químico, la biopelícula posee grupos químicos que por sí solos neutralizan al agente antimicrobiano.
4. El bajo nivel metabólico en una biopelícula aumenta la resistencia frente a agentes biocidas, como por ejemplo antibióticos activos frente a bacterias en fase de multiplicación⁹⁶.
5. Los microorganismos que coexisten en una misma biopelícula sufren cambios fenotípicos que aumentan la resistencia a los agentes antimicrobianos⁹⁷.

La presencia de biopelículas ha sido descrita tanto en la superficie externa de la raíz como en el interior del conducto radicular^{98,99}. Asimismo, *E. faecalis* es capaz de crecer formando biopelículas en las paredes del conducto radicular y en el interior de los túbulos dentinarios y demás irregularidades anatómicas, lo que le confiere mayor resistencia a la terapia endodóntica^{100,101,102,103}. Esto le ayuda a sobrevivir a los procedimientos de desinfección químico-mecánicos, resistir a la medicación intraconducto y/o adaptarse a un ambiente en el cual la disponibilidad de nutrientes es limitada o escasa^{104,105}. Cuando ésto sucede, se estimula un estado de inanición permitiendo a las bacterias persistir un largo periodo de tiempo en un estado viable pero no cultivable¹⁰⁶. Sin embargo, cuando las condiciones externas vuelven a ser favorables, son capaces de reactivarse y recuperar su tasa de crecimiento normal, manteniendo

⁹⁵ Ward KH, Olson ME, Lam K, Costerton JW. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. J Med Microbiol 1992;36:406-13.

⁹⁶ Huang CT, Yu FP, McFeters GA, Stewart PS. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. Appl Environ Microbiol 1995;61:2252-6.

⁹⁷ Cloete TE. Resistance mechanism of bacteria to antimicrobial compounds. Int Biodeterioration Biodegradation 2003;51:277-82.

⁹⁸ Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2002;28:12-55.

⁹⁹ 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.

¹⁰⁰ Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. Oral Microbiol Immunol 2003;18:121-6.

¹⁰¹ Distel J, Hatton J, Gillespie J. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod 2002;28:689-93.

¹⁰² George S, Kisben 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.

¹⁰³ Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. J Endod 2005;31:30-6.

¹⁰⁴ Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. Int Endod J 2001;34:1-10.

¹⁰⁵ Watson SP, Clements MO, Foster SJ. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1998;180:1750-8.

¹⁰⁶ Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. J Microbiol 2005;43:93-100.

su patogenicidad^{107,108,109,110}. *E. faecalis* es uno de los microorganismos capaces de alcanzar este estado cuando se expone a condiciones desfavorables^{111,112,113}.

1.3. TRATAMIENTO ENDODÓNTICO

El objetivo principal del tratamiento endodóntico es eliminar la infección del sistema de conductos radiculares y prevenir la reinfección. Ésto se lleva a cabo mediante la preparación químico-mecánica y la aplicación de medicación intraconducto. Debido a la complejidad anatómica del sistema de conductos radiculares, la instrumentación de dichos conductos no elimina completamente su contenido. Se ha demostrado que alrededor del 35% del área del conducto radicular queda sin instrumentar tras el tratamiento¹¹⁴ lo que indica que para la limpieza y desinfección de las paredes de los conductos principales, laterales y accesorios, y túbulos dentinarios sea necesario el uso de soluciones irrigadoras. Éstas serán una herramienta primordial a la hora del control y eliminación de las biopelículas del interior del sistema de conductos radiculares¹¹⁵.

La irrigación se define como el procedimiento mediante el cual se distribuye un líquido o irrigante en el sistema de conductos radiculares antes, durante y tras la instrumentación. Los objetivos de la irrigación son la eliminación del tejido pulpar, de restos de dentina y barrillo dentinario generados durante la instrumentación, así como de *biofilms* microbianos de las paredes de los conductos radiculares y del interior de los túbulos dentinarios. El irrigante debe a su vez lubricar los instrumentos empleados durante el tratamiento¹¹⁶. Idealmente, las soluciones irrigadoras

¹⁰⁷ Shen Y, Stojic S, Haapasalo M. Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture. *J Endod* 2010;36:1820–3.

¹⁰⁸ Lleó MM, Bonato B, Tafi MC, Signoreto 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.

¹⁰⁹ Signoreto 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.

¹¹⁰ 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.

¹¹¹ 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.

¹¹² 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.

¹¹³ 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.

¹¹⁴ Peters OA, Schonenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by microcomputed tomography. *Int Endod J* 2001;34:221–30.

¹¹⁵ 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.

¹¹⁶ 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.

deberían ser capaces de cumplir los objetivos anteriormente mencionados, además de no presentar toxicidad, tener una baja tensión superficial y una actividad antimicrobiana residual^{117,118} para eliminar las posibles bacterias que resisten el tratamiento, previniendo así la reinfección.

La importancia de usar una solución irrigadora con actividad antimicrobiana durante el tratamiento de conductos radiculares es conocida¹¹⁹. El hipoclorito sódico (NaClO) y la clorhexidina (CLX) son las soluciones irrigadoras con acción antimicrobiana más usadas en endodoncia; sin embargo, éstas no eliminan el componente inorgánico del barrillo dentinario ni los detritus de dentina que se crean con la instrumentación mecánica. Por ello, es necesaria la utilización de éstas junto a soluciones ácidas y quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido cítrico, entre otros.

1.3.1. BARRILLO DENTINARIO Y DETRITUS DE DENTINA

La acción de los instrumentos sobre las paredes de dentina genera una capa de residuos denominada barrillo dentinario, y favorece el acúmulo y retención de detritus de dentina en zonas a las que no llegan los instrumentos como son los istmos, conductos laterales y accesorios^{120,121,122}.

El barrillo dentinario o *smear layer* es una capa de unas 2,5 micras de espesor que se distribuye por la superficie tratada y que se extiende unas pocas micras en el interior de los túbulos dentinarios¹²³. Tiene una morfología irregular y un aspecto granular. Está formado por compuestos inorgánicos de la dentina, y compuestos orgánicos como restos de tejido pulpar, restos odontoblásticos, proteínas, sangre, fibras nerviosas, colágeno, fluidos tisulares, saliva y bacterias^{124,125,126}. Su composición va cambiando a medida que se instrumentan los conductos.

¹¹⁷ Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006;32:389-98.

¹¹⁸ 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.

¹¹⁹ 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.

¹²⁰ Hartmann MS, Barletta FB, Camargo Fontanella VR, Vanni JR. Canal transportation after root canal instrumentation: a comparative study with computed tomography. J Endod 2007;33:962-5.

¹²¹ Paqué F, Musch U, Hülsmann M. Comparison of root canal preparation using RaCe and ProTaper rotary Ni-Ti instruments. Int Endod J 2005;38:8-16.

¹²² Paqué F, Laib A, Gautschi H, Zehnder M. Hard-tissue debris accumulation analysis by high-resolution computed tomography scans. J Endod 2009;35:1044-7.

¹²³ Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorensen SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. J Dent Res 1970;49:1359-68.

¹²⁴ McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. J Endod 1975;1:238-42.

De esta forma, en un principio posee un mayor porcentaje de materia orgánica y, a medida que avanza la instrumentación y se va eliminando esa materia orgánica infectada, aumenta su contenido en materia inorgánica que es más difícil de eliminar¹²⁷. Lester y Boyde asumieron que estaba formado mayoritariamente por materia inorgánica ya que no era posible removerlo mediante NaClO¹²⁸.

La implicación clínica de los detritus y del barrillo dentinario, especialmente de este último, es bien conocida. Por un lado ejerce un efecto protector frente a los microorganismos presentes en el sistema de conductos radiculares y en los túbulos dentinarios^{129,130}. Por otro lado, puede interactuar de alguna forma con las soluciones irrigadoras aplicadas en el conducto e influir en su actividad¹³¹, lo cual explicaría la reducción de actividad cuando son aplicadas *in vivo*.

Hoy en día existe consenso sobre la importancia de eliminar tanto el barrillo dentinario como los detritus de dentina de los conductos radiculares infectados por los siguientes argumentos:

1. El barrillo dentinario y los detritus contienen bacterias y, tanto sus productos de desecho como la materia orgánica necrótica^{132,133}, pueden actuar como sustrato y alimento para las bacterias¹³⁴, constituyendo un reservorio de microorganismos^{135,136,137,138}.
2. Limitan el contacto directo de los agentes antimicrobianos con los microorganismos.

¹²⁵ Nakashima K, Terata R. Effect of pH modified EDTA solution to the properties of dentin. J Endod 2005;31:47-9.

¹²⁶ Kokkas AB, Boutsoukias ACh, Vassiliadis LP, Stavrianos CK. The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an in vitro study. J Endod 2004;30:100-2.

¹²⁷ Jodaikin A, Austin JC. Smear layer removal with chelating agents after cavity preparation. J Prosthet Dent 1981;46:171-4.

¹²⁸ Lester KS, Boyde A. Scanning electron microscopy of instrumented, irrigated and filled root canals. Br Dent J 1977;143:359-67.

¹²⁹ Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. J Endod 1983;9:137-42.

¹³⁰ Williams S, Goldman M. Penetrability of the smeared layer by a strain of *Proteus vulgaris*. J Endod 1985;11:385-8.

¹³¹ Gençoğlu N, Samani S, Günday M. Dentinal wall adaptation of thermoplasticized gutta-percha in the absence or presence of smear layer: a scanning electron microscopic study. J Endod 1993;19:558-62.

¹³² Cunningham WT, Martin H, Forrest WR. Evaluation of root canal débridement by the endosonic ultrasonic synergistic system. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1982;53:401-4.

¹³³ Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. J Endod 1983;9:137-42.

¹³⁴ George S, Kisben 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.

¹³⁵ Olgart L, Brännström M, Johnson G. Invasion of bacteria into dentinal tubules. Experiments *in vivo* and *in vitro*. Acta Odontol Scand 1974;32:61-70.

¹³⁶ Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. J Dent Res 1982;61:435-8.

¹³⁷ Williams S, Goldman M. Penetrability of the smeared layer by a strain of *Proteus vulgaris*. J Endod 1985;11:385-8.

¹³⁸ Meryon SD, Jakeman KJ, Browne RM. Penetration in vitro of human and ferret dentine by three bacterial species in relation to their potential role in pulpal inflammation. Int Endod J 1986;19:213-20.

3. Reducen la penetración de los agentes desinfectantes en el sistema de conductos radiculares y túbulos dentinarios, depositándose en las paredes dentales, obstruyéndolos^{139,140}.

4. Dificultan el sellado óptimo del sistema de conductos radiculares^{141,142}.

El uso de un quelante permite reducir la capa de barrillo y los detritus de dentina generados durante el proceso de instrumentación^{143,144,145}.

1.3.2. SOLUCIONES IRRIGADORAS

HIPOCLORITO SÓDICO (NaClO)

Es la solución irrigadora más empleada en el tratamiento endodóntico. Se trata de un compuesto halogenado cuyas funciones biológicas principales son disolver los restos de tejido pulpar y el componente orgánico del barrillo dentinario, así como destruir bacterias neutralizando sus metabolitos y productos antigénicos¹⁴⁶. Además de poseer un amplio espectro antibacteriano, es esporicida y viricida¹⁴⁷, barato y altamente disponible. Estas características llevaron a Cunningham *et al.* (1980)¹⁴⁸, a proponerlo como el irrigante más eficaz.

La acción biológica de NaClO depende de diversos aspectos, algunos de los cuales se describen a continuación:

1. Concentración: Se corresponde con la cantidad de cloro libre disponible por volumen de solución de NaClO. En endodoncia se ha utilizado a concentraciones variables, desde 0,5% hasta el 6%. El aumento de concentración incrementa sus propiedades de disolución y

¹³⁹ Outhwaite WC, Livingston MJ, Pashley DH. Effects of changes in surface area, thickness, temperature and postextraction time on human dentine permeability. *Arch Oral Biol* 1976;21:599–603.

¹⁴⁰ Raldi DP, Lage-Marques JL. In vitro evaluation of the effects of the interaction between irrigating solutions, intracanal medication and Er:YAG laser in dentin permeability of the endodontic system. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:278–85.

¹⁴¹ White RR, Goldman M, Lin PS. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. *J Endod* 1984;10:558–62.

¹⁴² Foster KH, Kuliild JC, Weller RN. Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. *J Endod* 1993;19:136–40.

¹⁴³ Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:658–66.

¹⁴⁴ Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* 2003;36:810–30.

¹⁴⁵ Scelza MF, Pierro V, Scelza P, Pereira M. Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:499–503.

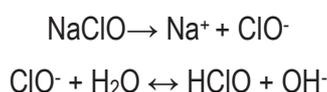
¹⁴⁶ Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35–40.

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

¹⁴⁸ 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.

antibacterianas^{149,150}, pero paralelamente también aumenta el efecto tóxico si alcanza el periápice^{151,152}.

2. pH: El efecto biológico del NaClO depende del equilibrio del cloro libre disponible. Éste lo constituyen el ión hipoclorito (ClO⁻) y el ácido hipocloroso (HClO)¹⁵³. En soluciones alcalinas, cuando el NaClO se disuelve en agua, ocurre la siguiente reacción:



El pH de la solución de NaClO determina este equilibrio. En soluciones alcalinas (pH > 7,5) prevalece el ClO⁻, el cual tiene un potente efecto oxidativo y, por lo tanto, mayor capacidad de disolución¹⁵⁴. Por otro lado, HClO predomina en soluciones ácidas (pH < 7,5). Éste tiene un potente efecto bactericida, probablemente, porque es una molécula más pequeña y sin carga que le permite penetrar más fácilmente a través de la membrana bacteriana, causando degradación de las proteínas y la consecuente muerte bacteriana^{155,156,157,158}.

3. Superficie de contacto: NaClO actúa por contacto directo entre las moléculas de cloro libre disponible y la materia orgánica. A mayor contacto, mayor efecto biológico del NaClO. Conocer

¹⁴⁹ 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.

¹⁵⁰ Zollinger A, Mohn D, Zeltner M, Zehnder M. Short-term storage stability of NaOCl solutions when combined with Dual Rinse HEDP. *Int Endod J* 2018;51:691-696.

¹⁵¹ Jiménez-Rubio A, Segura JJ, Llamas R, Jiménez-Planas A, Guerrero JM, Calvo JR. *In vitro* study of the effect of sodium hypochlorite and glutaraldehyde on substrate adherence capacity of macrophages. *J Endod* 1997;23:562-4.

¹⁵² 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.

¹⁵³ Baker RW. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins: 1. Physico-chemical study of the course of the reaction. *Biochem J* 1947;41:337-42.

¹⁵⁴ 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.

¹⁵⁵ Baker RW. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins: 1. Physico-chemical study of the course of the reaction. *Biochem J* 1947;41:337-42.

¹⁵⁶ Winter J, Ilbert M, Graf PC, Ozcelik D, Jakob U. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* 2008;135:691-701.

¹⁵⁷ 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.

¹⁵⁸ Bloomfield SF, Miles GA. Antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol* 1979;46:65-73.

las interacciones u obstáculos que impiden este contacto es fundamental para comprender el proceso de limpieza de NaClO¹⁵⁹.

4. Volumen y tiempo de irrigación: Son aspectos claves para conseguir un adecuado efecto biológico¹⁶⁰. No existe consenso sobre el volumen y tiempo de irrigación requeridos durante el tratamiento. Sin embargo, es importante tener presente que cuando NaClO es aplicado en el conducto radicular, reacciona con el contenido orgánico e inorgánico como la pulpa, el *biofilm* bacteriano, la dentina de las paredes del conducto, el barrillo dentinario y los detritus de dentina. Ésto causa una reducción del cloro libre disponible y resulta en una degradación proteica y cambios en el pH^{161,162,163}. Por ello, se recomienda refrescar las soluciones de NaClO en el interior del conducto radicular mediante una irrigación constante a lo largo del tratamiento endodóntico. El tiempo óptimo de irrigación aceptado por diversos autores para erradicar biopelículas de *E. faecalis* es de 3 minutos^{164,165,166}.

Una de las mayores desventajas del NaClO es que no elimina el componente inorgánico del barrillo dentinario ni de los detritus de dentina^{167,168}. Esto es un problema ya que los restos de dentina pueden actuar como barrera, impidiendo la propagación y difusión correcta del NaClO por la anatomía del sistema de conductos radiculares, y puede disminuir/inactivar su actividad

¹⁵⁹ Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. Int Endod J 1982;15:187-96.

¹⁶⁰ Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006;32:389-98.

¹⁶¹ de Groot SD, Verhaagen B, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR, van der Sluis LW. Laser-activated irrigation within root canals: cleaning efficacy and flow visualization. Int Endod J 2009;42:1077-83.

¹⁶² Jiang LM, Verhaagen B, Versluis M, van der Sluis LW. Evaluation of a sonic device designed to activate irrigant in the root canal. J Endod 2010;36:143-6.

¹⁶³ Macedo RG, Wesselink PR, Zaccheo F, Fanali D, Van Der Sluis LW. Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. Int Endod J 2010;43:1108-15.

¹⁶⁴ 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.

¹⁶⁵ 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.

¹⁶⁶ 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.

¹⁶⁷ Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. J Endod 1992;18:605-12.

¹⁶⁸ Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994;78:359-67.

antimicrobiana^{169,170}. De hecho, se ha demostrado que la dentina inhibe la capacidad antibacteriana del NaClO¹⁷¹.

AGENTES QUELANTES

Para eliminar el componente inorgánico de la capa de barrillo y los detritus de dentina se utilizan agentes quelantes fuertes como el EDTA y el ácido cítrico^{172,173}. Éstos se unen a los iones calcio de la dentina formando quelatos estables y solubles. Están indicados para aplicarse durante 1-2 minutos al finalizar la preparación mecánica. Una de las desventajas de los quelantes fuertes es que pueden erosionar en exceso la dentina debido a la descalcificación^{174,175} que provoca cambios en la estructura química de la misma^{176,177,178}, aumentando la permeabilidad y solubilidad, y disminuyendo la microdureza¹⁷⁹. Por otro lado, estos quelantes fuertes reaccionan con el NaClO disminuyendo su eficacia si son empleados en combinación^{180,181,182}.

Con el objetivo de evitar estos problemas, se ha propuesto el ácido etidróico o 1-hidroxi-etilideno-1,1-bisfosfonato (HEBP), como alternativa al EDTA. Es un quelante débil¹⁸³ no tóxico que se emplea para tratar enfermedades óseas^{184,185} y se incluye en la composición de

¹⁶⁹ Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod* 2013;39:1395-400.

¹⁷⁰ 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.

¹⁷¹ 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.

¹⁷² Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonça RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Júnior M, Magalhães PP, Santos MH, de Macêdo Farias L. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2010;36:894-8.

¹⁷³ Paqué F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *Int Endod J* 2011;44:148-53.

¹⁷⁴ Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17-9.

¹⁷⁵ Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J* 2002;35:934-9.

¹⁷⁶ Hennequin M, Pajot J, Avignant D. Effects of different pH values of citric acid solutions on the calcium and phosphorus contents of human root dentin. *J Endod* 1994;20:551-4.

¹⁷⁷ Doğan H, Qalt S. Effects of chelating agents and sodium hypochlorite on mineral content of root dentin. *J Endod* 2001;27:578-80.

¹⁷⁸ Tartari T, Bachmann L, Zancan RF, Vivan RR, Duarte MAH, Bramante CM. Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. *Int Endod J* 2018;51 Suppl 1:e42-e54.

¹⁷⁹ Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod* 1996;22:23-5.

¹⁸⁰ Baumgartner JC, Ibay AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod* 1987;13:47-51.

¹⁸¹ Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetracetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J* 2003;36:411-5.

¹⁸² Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20.

¹⁸³ De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J Jr, Paciornik S. Longitudinal co-site optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. *J Endod* 2008;34:71-5.

¹⁸⁴ Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999;25:97-106.

productos domésticos y cuidado personal como jabones¹⁸⁶. Este agente tiene la habilidad de eliminar el barrillo dentinario de una forma similar al EDTA, pero requiere mayor tiempo de contacto (5 minutos frente a 1 minuto del EDTA)¹⁸⁷. Su principal ventaja es que puede mezclarse con NaClO sin que haya una pérdida de las propiedades de ambas soluciones por separado. De esta forma, la mezcla de NaClO y HEBP es capaz de reducir la formación de barrillo dentinario¹⁸⁸ y el acúmulo de detritus de dentina en zonas no instrumentadas¹⁸⁹. Además, se ha demostrado que el HEBP no afecta a la capacidad de NaClO de eliminar biopelículas de *E. faecalis* de la superficie de la dentina¹⁹⁰ y del interior de los túbulos dentinarios¹⁹¹, ni altera su capacidad de disolver el tejido orgánico incluso en presencia de detritus de dentina^{192,193}. Por todo eso, la combinación de NaClO/HEBP parece ser una alternativa eficaz y podría ser utilizado como único irrigante durante y después de la instrumentación en el tratamiento endodóntico^{194,195}. La concentración propuesta de HEBP para su uso como solución irrigadora es del 9%¹⁹⁶ mezclada con NaClO.

¹⁸⁵ Aubut V, Pommel L, Verhille B, Orsière T, Garcia S, About I, Camps J. Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:e120-5.

¹⁸⁶ Coons D, Dankowski M, Diehl M, Jakobi G, Kuzel P, Sung E, Trubitsch U. Performance in detergents, cleaning agents and personal care products: detergents. In: Falbe J, ed. *Surfactants in consumer products*. Springer-Verlag: Berlin; 1987:197-305.

¹⁸⁷ De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J Jr, Paciornik S. Longitudinal co-site optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. *J Endod* 2008;34:71-5.

¹⁸⁸ Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J* 2009;42:335-43.

¹⁸⁹ Paqué F, Rechenberg DK, Zehnder M. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. *J Endod* 2012;38:692-5.

¹⁹⁰ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, Monteiro Bramante C, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 2015;48:1188-93.

¹⁹¹ 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.

¹⁹² Tartari T, Guimarães BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA, Bramante CM. Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *Int Endod J* 2015;48:399-404.

¹⁹³ Tejada S, Baca P, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT. Influence of dentine debris and organic tissue on the properties of sodium hypochlorite solutions. *Int Endod J* 2019;52:114-122.

¹⁹⁴ Tartari T, Guimarães BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA, Bramante CM. Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *Int Endod J* 2015;48:399-404.

¹⁹⁵ Yadav HK, Yadav RK, Chandra A, Tikku AP. A Scanning Electron Microscopic Evaluation of the Effectiveness of Etidronic Acid, SmearClear and MTAD in Removing the Intracanal Smear Layer. *J Dent (Shiraz)* 2017;18:118-126.

¹⁹⁶ Paqué F, Rechenberg DK, Zehnder M. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. *J Endod* 2012;38:692-5.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La acción antimicrobiana de la solución de NaClO sola o combinada con HEBP ha sido demostrada tanto en el interior de túbulos dentinarios infectados¹⁹⁷ como en la superficie de la dentina¹⁹⁸. Sin embargo, es bien conocido que algunas soluciones antisépticas con excelentes propiedades antimicrobianas *in vitro* pierden rápidamente su actividad cuando se aplican en un conducto radicular infectado¹⁹⁹. La presencia de barrillo dentinario así como de detritus de dentina, tanto en las zonas instrumentadas como en las no instrumentadas, limita el contacto directo de las soluciones con los microorganismos disminuyendo su acción antimicrobiana^{200,201}. Existe poca información sobre el efecto inhibitor de los detritus de dentina y del barrillo dentinario sobre la acción del NaClO solo y combinado con HEBP.

Por otro lado, los estudios sobre la actividad antimicrobiana de los irrigantes en el interior de los túbulos dentinarios no tienen en cuenta la acción de los instrumentos durante el tratamiento endodóntico^{202,203}. De esta forma, no se conoce el efecto de los diferentes protocolos de irrigación empleados durante la preparación químico-mecánica sobre la dentina infectada.

Por ello, en esta Tesis Doctoral se han planteado 3 objetivos generales, algunos con varios objetivos específicos, que se describen a continuación:

Objetivo general 1. Estudiar la influencia de los detritus de dentina en la actividad antimicrobiana de soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP.

Objetivo específico 1. Determinar el cloro libre y pH de soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP en ausencia y presencia de detritus de dentina en el tiempo.

Objetivo específico 2. Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP en ausencia y presencia de dentina frente a biopelículas de *E. faecalis*.

¹⁹⁷ 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.

¹⁹⁸ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, Monteiro Bramante C, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against Enterococcus faecalis biofilms. Int Endod J 2015;48:1188-93.

¹⁹⁹ Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. J Endod 2007;33:917-25.

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

²⁰² 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.

²⁰³ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, Monteiro Bramante C, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against Enterococcus faecalis biofilms. Int Endod J 2015;48:1188-93.

Objetivo específico 3. Evaluar *ex vivo* la acción antimicrobiana de soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP en ausencia y presencia de dentina frente a biopelículas de *E. faecalis* crecidas sobre superficies de dentina.

Objetivo general 2. Estudiar *ex vivo* la influencia del barrillo dentinario en la actividad de soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP.

Objetivo específico 1. Evaluar *ex vivo* la influencia del barrillo dentinario en la actividad antimicrobiana de soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP frente a *E. faecalis* en el interior de los túbulos dentinarios.

Objetivo específico 2. Determinar *ex vivo* la capacidad de soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP para eliminar el barrillo dentinario.

Objetivo general 3. Determinar la acción antimicrobiana y de eliminar el barrillo dentinario de distintos protocolos de irrigación durante la preparación químico-mecánica.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la exposición del material y métodos se describe, en primer lugar, el material empleado que incluye la bacteria y medios de cultivo, las soluciones irrigadoras y el método para la obtención del polvo de dentina. Finalmente, se expone la metodología desarrollada para la consecución de cada uno de los objetivos generales y específicos.

3.1. MATERIAL

3.1.1. CEPA BACTERIANA Y MEDIOS DE CULTIVO

En este estudio se ha utilizado la cepa de *E. faecalis* CECT 795 (Colección Española de Cultivos Tipo, Burjasot, Valencia). Los medios de cultivo empleados a lo largo del estudio fueron el caldo y agar infusión cerebro corazón (BHI) (*Brain Heart Infusion*, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España). El caldo BHI 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 $7,38 \pm 0,2$. 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. En ambos casos el medio se suplementó con 1,3% de glucosa.

Las bacterias se mantuvieron en tubos en lengüeta con agar BHI suplementado con glucosa al 1,3% a 4°C para su posterior utilización en los experimentos.

3.1.2. SOLUCIONES IRRIGADORAS

Las soluciones irrigadoras 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 irrigadoras utilizadas en este estudio incluyendo composición, fabricante y modo de preparación.

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

Para la neutralización del NaClO se empleó tiosulfato sódico (Panreac Química, Barcelona, España). Para su preparación se disolvieron 2,48 g de tiosulfato en agua destilada estéril hasta un volumen de 100 ml.

Tabla 3.1. Soluciones irrigadoras utilizadas

Solución empleada	Solución comercial/Fabricante	Preparación
Hipoclorito sódico al 1% y 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.
Ácido etidróico al 9%	Ácido etidróico (Cublen K8514GR; Zschimmer & Schwarz, Villarreal Castellón, España)	Se añadieron 9 g del ácido a 100 ml de agua destilada.
Hipoclorito sódico al 1% ó 2,5% mezclado con ácido etidróico al 9%	Hipoclorito sódico al 10% Ácido etidróico	Las soluciones se prepararon por separado a doble concentración y posteriormente se mezclaron volúmenes iguales en una proporción 1/1.
EDTA al 17%	EDTA (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU).	Se añadieron 17 g del ácido a 100 ml de agua destilada.

Todas las soluciones fueron homogeneizadas mediante agitación continua con unas varillas magnéticas y esterilizadas mediante filtros estériles de 0,45 µm (Sarstedt, Filtropur S 0.45, Nümbrecht, Alemania).

3.1.3. OBTENCIÓN DEL POLVO DE DENTINA

Para la obtención del polvo de dentina se siguió la metodología descrita por Haapasalo *et al.* (2000)^{204,205,206}, haciendo alguna modificación. Se emplearon dientes humanos extraídos, unirradiculares y libres de caries que se almacenaron en timol al 0,1% a 4°C hasta su uso. El empleo de tejido dentario de origen humano fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Granada (UGR-438).

Los dientes se cortaron horizontalmente por la unión amelocementaria utilizando una máquina de corte Accuton-50 (Struers, Copenhague, Dinamarca) con una velocidad de corte de 3.200 rpm e irrigación abundante con agua. Las coronas se desecharon y el cemento de la superficie de las raíces se eliminó puliendo con papel de carburo de silicio de 500 grit. Los conductos radiculares se instrumentaron con limas K #15-#25 (Colorinox, Maillefer SA, Ballaigues, Suiza) con el

²⁰⁴ Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000;33:126-31.

²⁰⁵ 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.

²⁰⁶ Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J* 2001;34:184-8.

objetivo de eliminar el tejido pulpar. Las muestras de dentina radicular obtenidas se lavaron con EDTA al 17% durante 5 minutos seguido de agua destilada en baño de ultrasonidos (BRANSONIC® Ultrasonic Cleaner, 5510E-MT, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EEUU) con el objetivo de eliminar los detritus generados durante la preparación.

A continuación, se secaron durante 2 días en el interior de una incubadora a 37°C para posteriormente pulverizarlas utilizando un mortero de ágata automático (Spex 8000M Mixer Mill; Spex Certiprep Industries Inc, NJ). El polvo de dentina obtenido se filtró usando filtros de 190 μm con el fin de eliminar las trazas de mayor tamaño y, finalmente, se esterilizó en el autoclave (Figura 3.1.).

Para evaluar el efecto de la dentina sobre las soluciones irrigadoras, éstas se probaron solas y mezcladas con polvo de dentina en una proporción 10 mg de polvo por cada 100 μl de solución irrigadora^{207,208,209}.

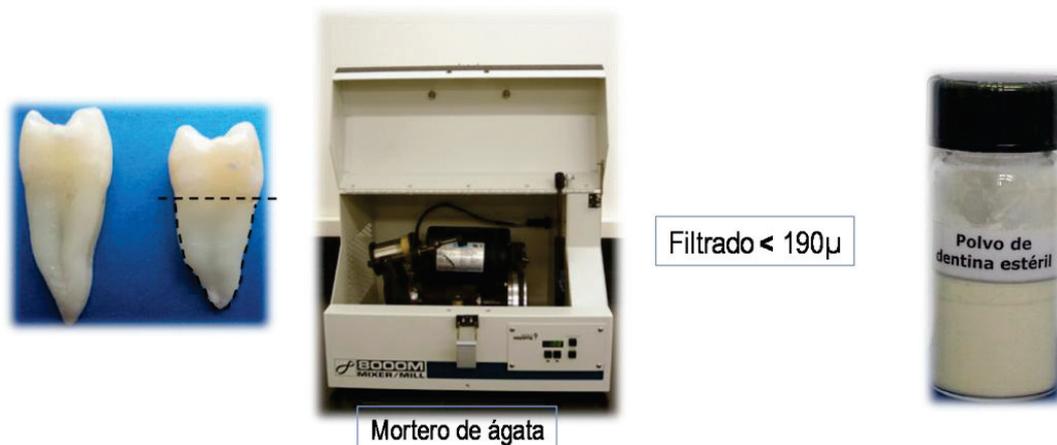


Figura 3.1. Obtención del polvo de dentina.

²⁰⁷ Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000;33:126-31.

²⁰⁸ 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.

²⁰⁹ Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J* 2001;34:184-8.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. INFLUENCIA DE LOS DETRITOS DE DENTINA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SOLUCIONES DE NaClO SOLAS Y COMBINADAS CON HEBP

3.2.1.1. DETERMINACIÓN DEL CLORO LIBRE

Debido a la inestabilidad de las soluciones de NaClO, se determinó la cantidad de cloro libre disponible de las soluciones irrigadoras en ausencia y presencia de polvo de dentina mediante un método yodométrico²¹⁰. El fundamento de la valoración del NaClO mediante este método radica en que el yoduro potásico (IK) es oxidado por el hipoclorito sódico en medio ácido (acético) y el yodo (I₂) liberado se titula mediante una solución de tiosulfato sódico. Para realizar el método yodométrico, los reactivos utilizados fueron: ácido acético glacial, yoduro potásico puro (exento de iodato), tiosulfato sódico N/10 (tiosulfato sódico pentahidrato [Na₂S₂O₃ · 5H₂O] 24.818 g y agua destilada c.s.p. 1000 ml) y solución de almidón (almidón soluble 2,5 g, agua destilada 250 ml).

Una vez preparados los reactivos, NaClO se diluyó hasta un grado clorométrico de 3,17 g/kg. El hipoclorito inicialmente valorado, tuvo una concentración de 100 g/l por lo que pudo diluirse 1/40 aproximadamente.

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se añadieron 100 ml de agua destilada (como base de dilución de los reactivos añadidos), 5 ml de ácido acético glacial, 1 g de IK, 10 ml de la dilución de hipoclorito y 2 - 3 ml de solución de almidón. Transcurridos 3 minutos se tituló con tiosulfato sódico N/10, hasta la desaparición del color azul (del almidón) (**Figura 3.2., A**). Para calcular el contenido de cloro libre se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{El contenido en g/l de cloro} = 0,355 \times N \times V/V'$$

N = número de mililitros gastados de tiosulfato; V/V' = inversa de la dilución del hipoclorito; 1 grado clorométrico = 3,17 gramos de cloro/kg

El cloro libre de las soluciones de NaClO al 1% y 2,5% solas y combinadas con HEBP en ausencia y presencia de polvo de dentina (10 mg/100 ml) se midió tras ser preparadas (basal) y a los 1, 3 y 10 minutos. Las soluciones de se mantuvieron en oscuridad hasta su uso. Se

²¹⁰ APHA (American Public Health Association). Standard methods for the examination of water and wastewater. 7^a ed. APHA. Washington;1989:4-51.

realizaron 3 determinaciones de cloro libre por solución en ausencia y presencia de polvo de dentina y se calculó la media de las 3 determinaciones.

3.2.1.2. DETERMINACIÓN DEL PH

El pH de las soluciones de NaClO al 1% y 2,5% solas y combinadas con HEBP en ausencia y presencia de polvo de dentina (10 mg/100 ml) se midió utilizando un pH-metro (micropH 2001 Crison, Alella, España).

Se realizaron 3 determinaciones del pH de las soluciones inmediatamente después de ser preparadas (basal) y tras 1, 3 y 10 minutos (**Figura 3.2., B**). Las soluciones de NaClO se mantuvieron en oscuridad hasta su uso. Se calculó la media de las 3 determinaciones.

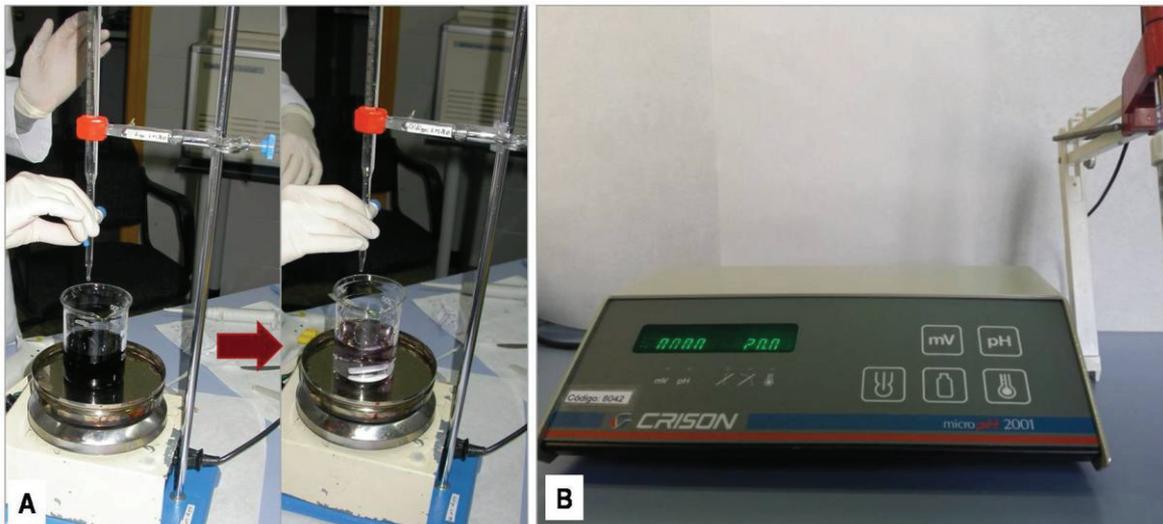


Figura 3.2.A: Determinación del cloro libre y **B:** pH de las soluciones de NaClO.

3.2.1.3. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A BIOPELÍCULAS DE *E. FAECALIS*

Para determinar la actividad bactericida de las soluciones de NaClO al 1% y 2,5% solas y combinadas con HEBP en ausencia y presencia de polvo de dentina, se utilizó el dispositivo conocido originariamente como *Calgary Biofilm Device* (CBD, MBEC™ High-throughput [HTP]; Innovotech Inc., Edmonton, Alberta, Canadá)^{211,212}. Este dispositivo consta de dos partes; la

²¹¹ Innovotech. Página web: <http://www.innovotech.ca/>.

²¹² 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.

superior es una tapadera de poliestireno con 96 pivotes o *pegs* (llamada *peg lid*), que encaja en una placa de microtiter estándar de 96 pocillos. La parte inferior es un recipiente ondulado en el que se añade la suspensión bacteriana inicial. Cuando el dispositivo completo se coloca en un agitador de balanceo, el caldo fluye alrededor de los *pegs* favoreciendo la adhesión de las bacterias planctónicas a las paredes de éstos formando una biopelícula; al mismo tiempo, las células planctónicas se desprenden de la superficie (Figura 3.3.).

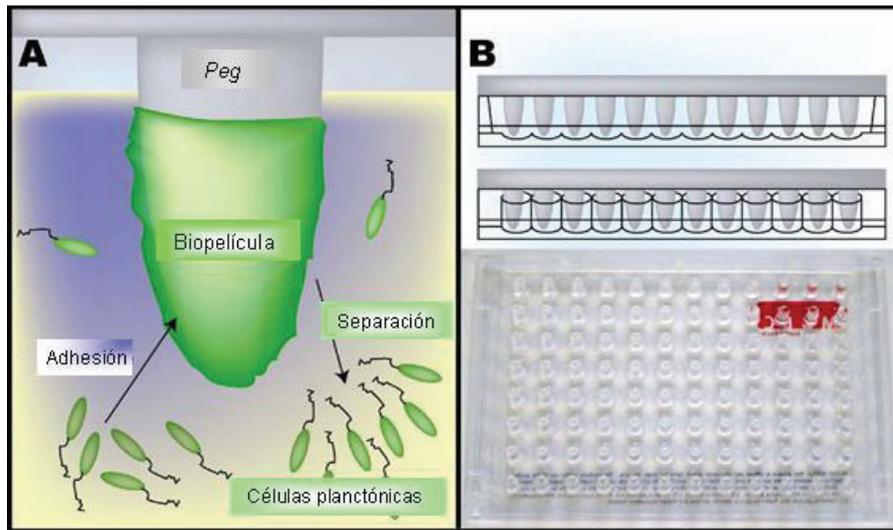


Figura 3.3. Dispositivo MBEC™ HTP. **A:** Las biopelículas se forman en las paredes de los *pegs* de poliestireno cuando las bacterias planctónicas se adhieren irreversiblemente a la superficie. A su vez las células planctónicas se separan de la superficie de la biopelícula. **B:** Detalle de la tapadera (*peg lid*) que consta de 96 *pegs* idénticos y encaja perfectamente en una placa de microtiter de 96 pocillos.

Para la formación de las biopelículas de *E. faecalis* se utilizó una suspensión bacteriana ajustada a una densidad óptica 1.0 de la escala de McFarland en un turbidímetro (bioMérieux S.A. France, modelo DensiCHEK™ plus 180330-1, Lyon, Francia). Esta suspensión se diluyó 1/30 en caldo BHI suplementado con glucosa (que equivale aproximadamente a 10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro, UFC/ml) y 22 ml de la misma se añadieron a la base del MBEC™ HTP sobre la que se colocó la tapadera con los 96 *pegs*.

El dispositivo completo se situó sobre un agitador de balanceo (OVAN, modelo Swing Sw 8 10000-00015, Badalona, España) en una incubadora a 37°C y 95% de humedad relativa durante 5 días, para facilitar la formación de las biopelículas. El medio de cultivo fue refrescado cada 2 días. El agitador de balanceo oscila 5 revoluciones por minuto y forma un ángulo de ± 8 grados.

Este movimiento es simétrico (**Figura 3.4.**). Los *pegs* tienen un área de superficie de aproximadamente 109 mm² con una carga electrostática neutra. Una vez que el *peg lid* se coloca sobre la base del MBEC™ HTP, la punta redondeada del *peg* se sumerge alrededor de 3-4 mm en el medio. Durante el movimiento en el agitador de balanceo, la interfase aire-líquido se encuentra 4-5 mm por encima de la punta del *peg*²¹³.

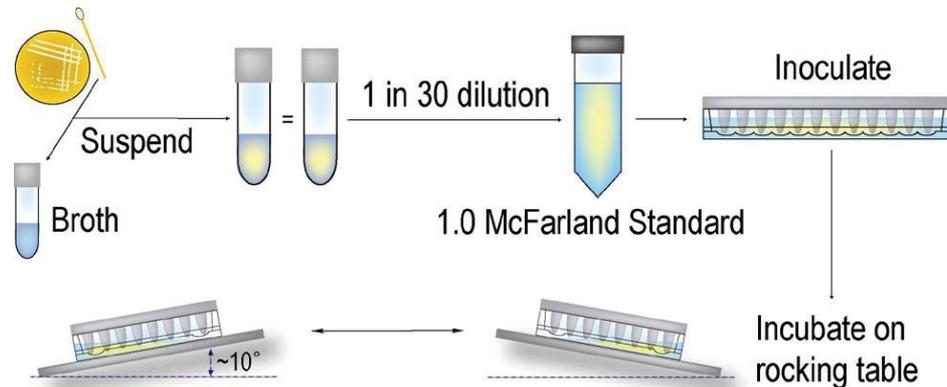


Figura 3.4. Inoculación del dispositivo MBEC™ HTP con una suspensión bacteriana en BHI ajustada a una densidad óptica 1.0 de la escala de McFarland. Esta suspensión se diluyó 1/30 en BHI y sirvió para inocular la base del dispositivo con 22 ml. El dispositivo completo se incubó a 37 °C en un agitador de balanceo durante 5 días.

Transcurrido el período de incubación, se retiró el dispositivo MBEC™ HTP del agitador de balanceo. A continuación, el *peg lid* se separó de la base y se colocó sobre una *placa de lavado* de microtiter de 96 pocillos de fondo plano (Nunclon Delta Surface, Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 180 µl de solución salina por pocillo, durante 2 minutos con el fin de eliminar las bacterias débilmente adheridas a la biopelícula. La base del MBEC™ HTP se desechó. Seguidamente se cortaron 4 *pegs* con una hoja de bisturí del n° 15 (Paragon, Sheffield, Inglaterra) calentada al rojo cereza en un mechero Bunsen. Estos pocillos sin *pegs* sirvieron como control de esterilidad.

Una vez lavadas las biopelículas, se sumergieron en una *placa de ensayo* que contenía 180 µl de las soluciones irrigadoras en ausencia y presencia de polvo de dentina (10 mg/100 ml). Las soluciones fueron: NaClO al 1%; NaClO al 1%/HEBP al 9%; NaClO al 2,5%; NaClO al 2,5%/HEBP al 9%; HEBP al 9%. El tiempo de exposición fue de 3 minutos. Se incluyeron pocillos

²¹³ Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proced Online* 2006;8:194-215.

con BHI (sin solución irrigadora) que sirvieron como control positivo. Trascorrido el tiempo de contacto, el *peg lid* se lavó dos veces en dos *placas de lavado*, durante 2 minutos cada una, para eliminar la posible actividad antibacteriana residual de las soluciones. A continuación, se transfirió a una *placa de recuperación* que contenía 180 μ l de caldo BHI por pocillo. Se sometió a vibración en el baño de ultrasonido (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España) a 60 Hz durante 10 minutos con el objetivo de romper la estructura de la biopelícula y resuspenderla en el caldo BHI (**Figura 3.5**). A continuación se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-5}) y gotas de 10 μ l de cada una de las diluciones se sembraron en placas de BHI agar suplementado con glucosa (**Figura 3.6**). Éstas se incubaron a 37°C durante 24 horas y, posteriormente, se hicieron los recuentos de células viables (UFCs). Se obtuvo la media y desviación estándar de los recuentos de UFC/ml. El término “erradicación” fue empleado para indicar el 100% de muerte bacteriana.

Toda la experiencia se realizó en una cámara de flujo laminar (Telstar S.A., modelo Bio-II-B, Terrasa, España) para evitar la contaminación durante el procedimiento. Cada solución irrigadora en ausencia y presencia de dentina se evaluó en dos *placas de prueba* distintas, 5 repeticiones por placa, obteniendo un total de 10 determinaciones.

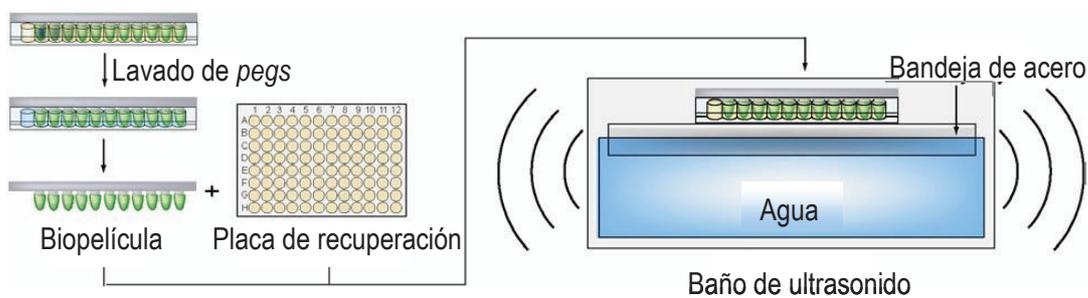


Figura 3.5. Recuperación de las biopelículas bacterianas. Tras la exposición a las soluciones irrigadoras, los *pegs* se lavaron dos veces en dos placas de lavado. Para la resuspensión de las biopelículas, el *peg lid* se introdujo en la placa de recuperación y se agitó en el baño de ultrasonido.

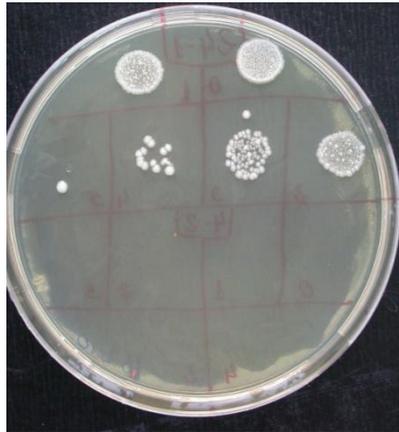


Figura 3.6. Tras resuspender las biopelículas y hacer diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-5}), se sembraron 10 μ l de cada dilución en una placa de BHI suplementada con glucosa para su posterior recuento tras las 24h.

3.2.1.4. EVALUACIÓN *EX VIVO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES FRENTE A BIOPELÍCULAS DE *E. FAECALIS* SOBRE SUPERFICIES DE DENTINA

Para esta experiencia se siguió el método previamente descrito por Arias-Moliz *et al.* (2014)²¹⁴. Como sustrato para la formación del *biofilm* de *E. faecalis* se utilizaron unidades volumétricas de dentina (UVDs). Se seleccionaron doce molares humanos extraídos y libres de caries que se almacenaron en una solución de timol al 0,1% a 4°C hasta su utilización. Los dientes fueron seccionados transversalmente con la máquina Accuton-50 (Struers, Copenhagen, Dinamarca) con una velocidad de corte de 3.200 rpm e irrigación abundante de agua. Se descartaron los 2/3 apicales de la raíz y el esmalte oclusal de la corona para obtener una superficie plana de dentina coronal. En el caso de que quedara alguna isla de esmalte, se eliminó mediante pulido con papel de carburo de silicio de 220 grit. A partir de esa sección de dentina coronal se cortaron bloques de los que se seleccionaron aquéllos que sólo tenían dentina. El tamaño de cada uno de los bloques se ajustó utilizando un calibre (Mitutoyo, nº 293-561, 7164778, Japón) y puliendo con papel de carburo de silicio de 220 y 500 grit en orden ascendente, hasta conseguir especímenes de 2 x 2 x 1,2 mm (ancho x largo x alto) que constituyeron lo que denominamos UVDs (**Figura 3.7.**). El número de bloques obtenidos de cada molar fue 5, obteniendo un total de 40 UVDs.

²¹⁴ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, Monteiro Bramante C, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 2015;48:1188-93.

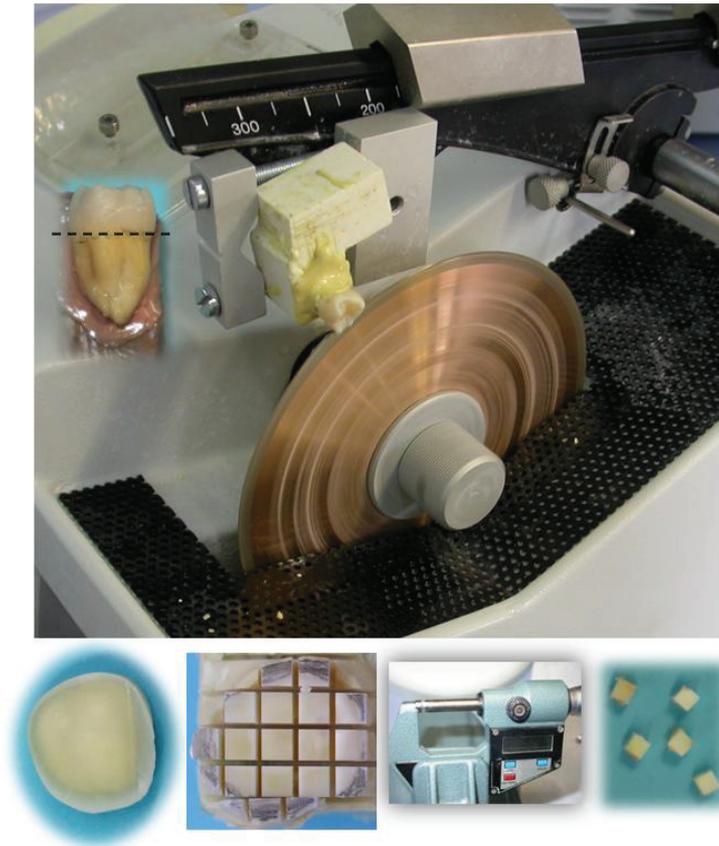


Figura 3.7. Obtención de las unidades volumétricas de dentina (UVDs).

El barrillo dentinario o *smear layer* formado durante la preparación de los bloques de dentina se eliminó sumergiéndolos en EDTA al 17% durante 5 minutos seguido de agua destilada, en baño de ultrasonidos. A continuación, las UVDs se esterizaron en autoclave y se incubaron en caldo BHI durante 24 horas a 37°C para asegurar que no había contaminación bacteriana. Finalmente, se conservaron en solución salina estéril hasta que fueron utilizadas.

Para formar las biopelículas de *E. faecalis* se utilizó el dispositivo MBEC™ HTP. Para ello, se cortó 1 mm de la punta de los *pegs* con la ayuda de un bisturí caliente. Los bloques de dentina se pegaron a la punta de los *pegs* seccionadas, mediante resina compuesta fluida (Tetric EvoFlow, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) que posteriormente se polimerizó con luz ultravioleta (Bluephase®, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) (**Figura 3.8.**). La base del dispositivo MBEC™ HTP se inoculó con 22 ml de una dilución 1/30 del 1 de McFarland sobre la que se colocó el *peg lid* con los bloques de dentina. El dispositivo se incubó 5 días a 37°C en condiciones aeróbicas sobre una mesa de balanceo, refrescando el medio BHI cada dos días.

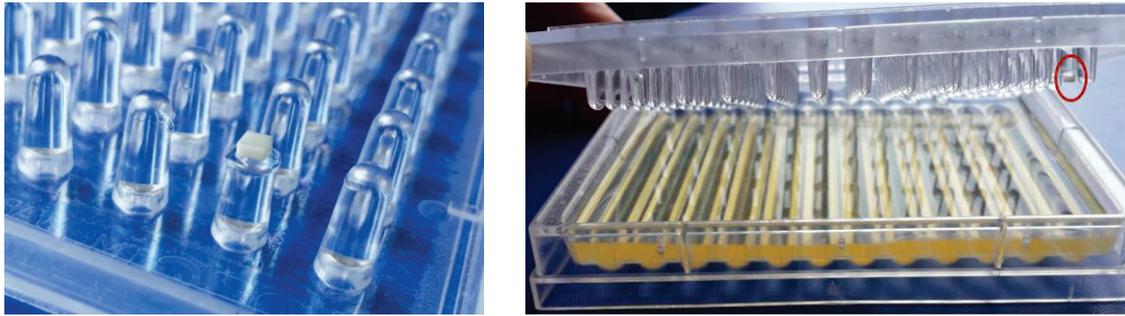


Figura 3.8. Adhesión de las UVDs a los *pegs* para la formación de las biopelículas en el dispositivo MBEC™ HTP.

Una vez formadas las biopelículas, los bloques de dentina se separaron de los *pegs* con la ayuda de pinzas estériles y se sumergieron durante 2 minutos en los pocillos de una placa de microtiter de 96 pocillos que contenían 180 μ l de solución salina al 0,9% con el fin de eliminar las bacterias débilmente adheridas. A continuación, se procedió a la asignación de los grupos de estudio. Cada una de las 5 UVDs/molar se asignó aleatoriamente a los 12 grupos de estudio ($n = 5$): grupo 1: NaClO al 1%, grupo 2: NaClO al 1%/HEBP al 9%, grupo 3: NaClO al 2,5%, grupo 4: NaClO al 2,5%/HEBP al 9%, grupo 5: HEBP al 9% y grupo 6: agua destilada (control). Los grupos del 7 al 12 consistieron en las mismas soluciones de los grupos 1 a 6 pero mezcladas con polvo de dentina (10 mg/100 ml).

Los bloques de dentina se expusieron a 100 μ l de las soluciones irrigadoras en ausencia y presencia de dentina durante 3 minutos, tras lo cual se sumergieron en pocillos con 180 μ l de tiosulfato sódico durante 5 minutos con el objetivo de neutralizar el hipoclorito de las soluciones y eliminar la interferencia con los fluorocromos que se utilizaron posteriormente²¹⁵.

Tras la neutralización, los bloques se lavaron y se tiñeron con los fluorocromos Syto-9 e Ioduro de propidio (IP) (Live/Dead, BacLigth, Invitrogen, Eugene, OR, EEUU). Ambos fluorocromos tiñen los ácidos nucleicos, discriminando las células viables de las muertas en base a la integridad de la membrana. Syto-9 es una molécula pequeña verde fluorescente que atraviesa las membranas permeables tiñendo las células de verde mientras que IP es una molécula roja impermeable a la membrana, por lo que no atraviesa las membranas intactas y sólo tiñe las

²¹⁵ Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, Duarte MA. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. Int Endod J. 2012;45:162-8.

bacterias con membranas dañadas^{216,217}. Los fluorocromos se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante, para lo cual se mezclaron 1 ml de solución salina con 1,5 µl de Syto-9 y 1,5 µl de IP. Para teñir las muestras, cada una se sumergió en un pocillo con 100 µl de la mezcla de los fluorocromos durante 15 minutos. A continuación, se lavaron con solución salina y se observaron bajo el microscopio laser confocal (MLC, Nikon Eclipse Ti-E, Nikon Canada, Mississauga, Canadá) del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. Para ello se montaron en placas 60 µ-Dish (Ibidi, Martinsried, Alemania) con medio de montaje (BacLigth, Invitrogen, Eugene, OR, EEUU). Las longitudes de onda de absorción/emisión fueron 494/518 nm para Syto-9 y 536/617 nm para IP. Se escanearon 4 áreas (*stack*) al azar de cada muestra (un total de 20 campos por grupo) utilizando un objetivo de inmersión de 40x, step size de 1 µm y una resolución de 512 x 512 píxeles. Cada *stack* representaba un área de 317 x 317 µm. El escaneo se realizó desde la superficie de la biopelícula hasta la superficie de la dentina.

La cuantificación de la fluorescencia se realizó mediante el software *bioImage_L*²¹⁸. Los parámetros evaluados en cada grupo fueron el biovolumen total (µm³) y el biovolumen de células vivas (verdes).

Previo a la realización del experimento, se confirmó el crecimiento de las biopelículas en la superficie de los bloques de dentina mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Las muestras se prepararon en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas del Servicio de Microscopía Electrónica del CIC de la Universidad de Granada. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M, pH = 7,4 durante 2 horas, a 4°C.
2. Se lavaron en el mismo tampón (3 veces, 15 minutos cada una a 4°C).
3. Se deshidrataron en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol, con los siguientes pasos: etanol 50%, 15 minutos; etanol 70%, 15 minutos; etanol 90%, 15 minutos y etanol 100%, 2 cambios de 15 minutos.

²¹⁶ Molecular probes: Product information LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability Kit. 2001.

²¹⁷ Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 1999;37:77-86.

²¹⁸ Chavez 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.

4. Se desecaron por el método por punto crítico²¹⁹ con dióxido de carbono en un secador de punto crítico (Polaron CPD7501).
5. Las muestras se recubrieron con oro (Sputter coater, Polaron SC7640).
6. Finalmente se observaron en el MEB (Hitachi S-510; Hitachi Ltd, Tokio, Japón).

3.2.2. EVALUACIÓN *EX VIVO* DE LA INFLUENCIA DEL BARRILLO DENTINARIO EN LA ACTIVIDAD DE SOLUCIONES DE NaClO SOLAS Y COMBINADAS CON HEBP

3.2.2.1. EVALUACIÓN *EX VIVO* DE LA INFLUENCIA DEL BARRILLO DENTINARIO EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES FRENTE A *E. FAECALIS* EN EL INTERIOR DE LOS TÚBULOS DENTINARIOS

Para esta experiencia se siguieron los métodos previamente descritos por Ma *et al.* (2011)²²⁰ y modificados por Arias-Moliz *et al.* (2014)²²¹. Se seleccionaron veintidós premolares humanos recién extraídos y se almacenaron en una solución de timol al 0,1% a 4°C hasta su uso. De cada diente se obtuvo un segmento radicular de 4 mm de longitud, cortando la raíz horizontalmente 1 mm por debajo de la unión amelocementaria, con ayuda de la máquina de corte Accuton-50. El resto apical de la raíz se desechó. Los conductos radiculares de los segmentos se estandarizaron con una fresa Gates-Glidden del número 4. Posteriormente, los segmentos se dividieron en mitades empleando un disco de diamante (355514220 HP, Edenta AG, AU/St Gallen, Suiza) en una pieza de mano de baja velocidad. El cemento externo de cada mitad se eliminó y el tamaño se ajustó usando un calibre y puliendo con papel de carburo de silicio de 220 a 800 grit para obtener muestras de 4 × 4 × 2 mm (**Figura 3.8.**). La capa de barrillo formada durante la preparación de las muestras de dentina se eliminó tratando la superficie con EDTA al 17% durante 5 minutos en baño de ultrasonidos. Posteriormente, se lavaron con agua destilada durante 10 minutos y se esterizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C. La esterilidad de la dentina se verificó incubando cada muestra en 5 ml de BHI a 37°C durante 24 horas.

²¹⁹ Anderson TF. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans NY Acad Sci* 1951;13:130-3.

²²⁰ 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.

²²¹ 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.

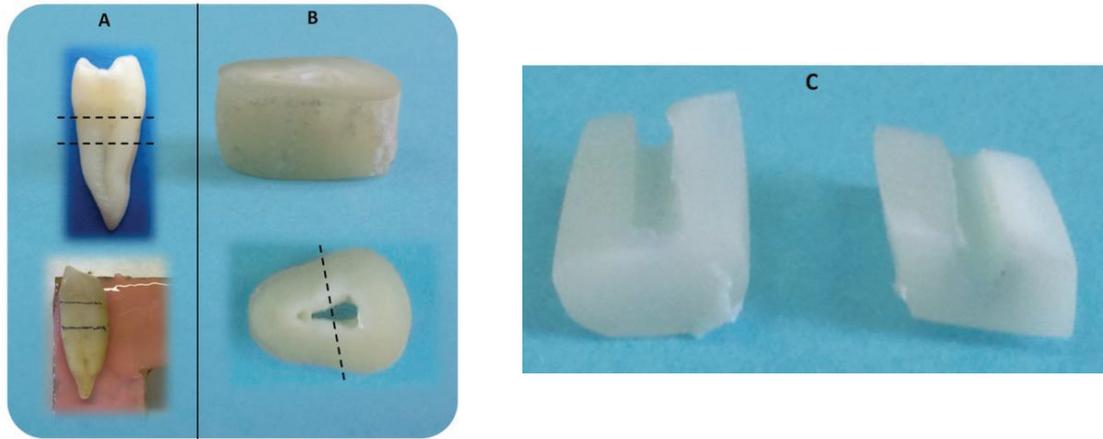


Figura 3.8. Obtención de los bloques de dentina de 4 x 4 x 2 mm. **A:** Sección transversal para obtener segmentos de 4 mm; **B:** Segmento de 4 mm. Los segmentos se seccionaron en dos mitades por la línea discontinua; **C:** Segmento cortado por la mitad.

Para infectar los túbulos dentinarios, las muestras de dentina preparadas se colocaron en la cámara superior de un tubo de filtro (VWR International Eurolab SL, Barcelona, España) con el conducto hacia arriba y con la ayuda de unas pinzas estériles. Los espacios que quedaban con la pared interna del tubo se sellaron con resina compuesta fluida (Tetric EvoFlow) que se fotopolimerizó con luz ultravioleta durante 20 segundos. Posteriormente se agregaron 500 μ l de una suspensión de *E. faecalis* de aproximadamente 1×10^7 UFC/ml, a la cámara superior de cada tubo de filtro con la muestra de dentina dentro. Los tubos se centrifugaron a 1400 g, 2000 g, 3600 g, y 5000 g secuencialmente (dos veces cada una, durante 5 minutos). Entre cada centrifugación, la suspensión bacteriana se reemplazó con 500 μ l de una nueva. Las muestras se incubaron un total de 5 días a 37°C, realizando el mismo procedimiento de centrifugación a los 2 días. Después del período de incubación, las muestras se sacaron de cada tubo y se lavaron con solución salina durante 1 minuto.

A continuación se procedió a la asignación de las muestras a los diferentes grupos de estudio. Treinta muestras se dividieron aleatoriamente en 6 grupos (n=5) en función de las soluciones irrigadoras y la ausencia o presencia de barrillo dentinario: grupo 1: NaClO al 2,5% sin barrillo, grupo 2: NaClO al 2,5%/HEBP al 9% sin barrillo, grupo 3: NaClO al 2,5% con barrillo, grupo 4: NaClO al 2,5%/HEBP al 9% con barrillo, grupo 5: agua destilada y grupo 6: agua destilada con barrillo. Los grupos 5 y 6 fueron los controles positivos.

Además, se incluyeron cuatro muestras no infectadas adicionales, 2 sin y 2 con la capa de barrillo dentinario, como controles negativos para confirmar la esterilidad de la técnica. Éstas siguieron los mismos pasos que las muestras de los grupos de estudio a excepción de la solución de irrigación que fue agua destilada estéril.

Para formar la capa de barrillo dentinario en las paredes del conducto radicular, se utilizó una lima rotatoria ProTaper SX (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza) durante 10 segundos a 250 rpm. La formación de barrillo dentinario se confirmó mediante MEB. La irrigación se realizó colocando 15 μ l de las soluciones de irrigación en la pared del conducto radicular durante 3 minutos. Posteriormente, el NaClO de los grupos 1 al 4 se inactivó mediante la adición de 5% de tiosulfato de sodio durante 5 minutos. Las muestras se lavaron con solución salina durante 1 minuto y se cortaron verticalmente en mitades por el conducto radicular utilizando una máquina Accuton-50 con solución salina como irrigante, con el objetivo de exponer una superficie fresca para ser escaneada (**Figura 3.9.**). A continuación, se lavaron con solución salina, se tiñeron utilizando los fluorocromos Syto-9 e IP como se ha descrito anteriormente y se observaron al MLC. Se escanearon 4 *stacks* al azar de cada muestra (un total de 20 campos por grupo) usando un objetivo de inmersión de 40x, step size de 1 μ m y una resolución de 512 \times 512 píxeles. Cada imagen representaba un área de 317 \times 317 μ m. El escaneo se realizó dentro de la estructura dentinaria, a 5-10 μ m del nivel subsuperficial de la dentina, con el fin de obtener la fluorescencia de las bacterias no afectadas por el procedimiento de corte.

La cuantificación de la fluorescencia se realizó mediante el software *bioImage_L*²²². El parámetro evaluado en cada grupo fue el porcentaje de células muertas (rojas).

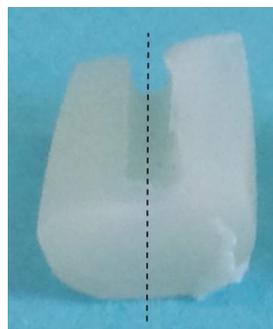


Figura 3.9. Corte vertical por el conducto radicular.

²²² Chavez 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.

3.2.2.2. DETERMINACIÓN *EX VIVO* DE LA CAPACIDAD DE LAS SOLUCIONES PARA ELIMINAR EL BARRILLO DENTINARIO

Con el fin de confirmar la formación de la capa de barrillo en las paredes del conducto radicular de los controles positivos y, observar el efecto de NaClO al 2,5% solo y combinado con HEBP en la capa de barrillo, 4 muestras adicionales de los grupos 3 (NaClO al 2,5% con barrillo), 4 (NaClO al 2,5%/HEBP al 9% con barrillo) y 6 (agua destilada con barrillo) se observaron bajo MEB. Tras la exposición a las soluciones irrigadoras, las muestras se prepararon siguiendo el mismo protocolo descrito al final del punto 2.2.1.4. Se tomaron cinco microfotografías digitales a 1500× de las paredes del conducto radicular de cada muestra (un total de 20 campos por grupo) con el objetivo de evaluar la capa de barrillo. Posteriormente se cuantificó el número de túbulos con y sin la capa de barrillo dentinario y se calculó el porcentaje medio de túbulos limpios (sin barrillo) por grupo.

3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y DE ELIMINAR BARRILLO DENTINARIO DE DISTINTOS PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN DURANTE LA PREPARACIÓN QUÍMICO-MECÁNICA

Para esta experiencia se siguieron los métodos previamente descritos por Ma *et al.* (2011)²²³ y Arias-Moliz *et al.* (2014)²²⁴. Se seleccionaron sesenta y seis premolares unirradiculares humanos extraídos, libres de caries y se almacenaron en una solución de timol al 0,1% a 4°C hasta su uso. Los dientes se decoronaron usando una máquina Accuton-50, y la parte coronal de la raíz se redujo hasta obtener especímenes radiculares de 12 mm de longitud. La longitud de trabajo se determinó a 1 mm del ápice radicular. El cemento externo se eliminó mediante pulido con papel de carburo de silicio de 220 grit y cada conducto radicular se instrumentó utilizando limas-K hasta un tamaño #25 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza), usando agua destilada como irrigante.

Para facilitar el manejo de las raíces durante el experimento, se fabricó un molde personalizado de cada una de ellas con material de impresión de polivinilsiloxano (Zhermack, Rovigo, Italia) (**Figura 3.10., A**). A continuación, se obtuvieron segmentos de raíz cilíndricos de 4 mm de longitud seccionando la raíz horizontalmente desde la parte coronal (**Figura 3.10., B y C**). Estos segmentos de raíz se seccionaron verticalmente en dos mitades con un disco de diamante montado en una pieza de mano a baja velocidad (**Figura 3.9., D**) de la misma forma como se ha explicado en el apartado 3.2.2.1.

²²³ 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.

²²⁴ 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.

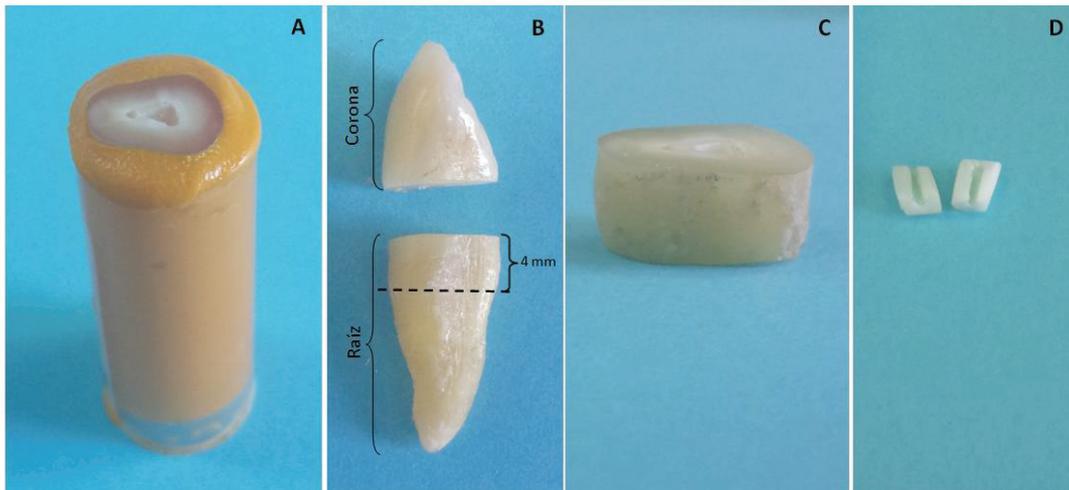


Figura 3.10. A: molde personalizado de cada muestra; B: raíz de donde se obtuvieron los segmentos; C: segmento de 4 mm; D: segmento cortado por la mitad.

En este ensayo, a diferencia del descrito en el apartado 3.2.2.1, el resto apical de la raíz no se desechó. La capa de barrillo formada durante la preparación de las muestras, incluidas las dos mitades de los segmentos coronales y el resto de la raíz, se eliminó con EDTA al 17% en un baño ultrasónico durante 5 minutos. Luego, las muestras se lavaron con agua destilada y se esterizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C. La esterilidad de la dentina se verificó incubando cada muestra en 5 ml de BHI a 37°C durante 24 horas.

Para contaminar los túbulos dentinarios de las mitades de los segmentos coronales, se siguió el mismo procedimiento explicado en el apartado 3.2.2.1. Cada mitad se colocó en la cámara superior de un tubo de filtro con el canal hacia arriba y se infectó con una suspensión de *E. faecalis* de aproximadamente 1×10^7 UFC/ml con la ayuda de centrifugaciones. Las muestras se incubaron durante un total de 5 días a 37°C, repitiendo el mismo procedimiento de centrifugación a los dos días.

Para la infección del resto de la raíz, cada una se contaminó con 1,2 ml de la suspensión *E. faecalis* en un tubo Eppendorf durante 5 días a 37°C, refrescando el medio cada 2 días.

Una vez pasado el periodo de incubación, las dos mitades de los segmentos coronales y el resto de la raíz de cada espécimen, se extrajeron de los tubos y se lavaron con solución salina durante

1 minuto. Posteriormente se ensamblaron con cera y se introdujeron en los moldes de silicona, de forma que en el molde estaba la raíz completa.

A continuación, se procedió a la asignación de las muestras en los grupos de estudio. Las muestras se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales según el protocolo de irrigación (n=10): grupo 1: agua destilada durante y después de la instrumentación, grupo 2: NaClO al 2,5% durante y después de la instrumentación, grupo 3: NaClO al 2,5%/HEBP al 9% durante y después de la instrumentación y grupo 4: NaClO al 2,5% durante la instrumentación seguido de EDTA al 17% (Merck, Darmstadt, Alemania) después de la instrumentación. Diez especímenes contaminados pero que no fueron irrigados ni instrumentados sirvieron como grupo control positivo.

Las raíces en los moldes se instrumentaron utilizando el sistema de limas rotatorias ProTaper Universal, limas SX, S1, S2, F1, F2 y F3 a longitud de trabajo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los conductos radiculares se irrigaron entre cada cambio de lima con 1 ml de la solución irrigadora. Tras la instrumentación, las raíces se irrigaron con 3 ml de la solución irrigadora final durante 1 minuto. Posteriormente, los conductos de los grupos que incluían NaClO se irrigaron con 5 ml de tiosulfato de sodio al 5% durante 5 minutos para inactivarlo y, finalmente, todos los conductos radiculares se lavaron con 5 ml de solución salina al 0,9%. Los procedimientos de irrigación se realizaron con una aguja de salida lateral de 27 G unida a una jeringa Luer lock de 3 ml (Monoject, Covidien, Mansfield, MA).

Después de este procedimiento, los segmentos coronales se sacaron de cada molde y el resto de la raíz se descartó. Cada mitad se lavó con solución salina durante 1 minuto y se cortó verticalmente en mitades por el conducto radicular utilizando una máquina Accuton-50 con solución salina como irrigante, con el objetivo de exponer una superficie fresca para ser escaneada (**Figura 3.11**). A continuación, se lavaron con solución salina, se tiñeron utilizando los fluorocromos Syto-9 e IP y se observaron al MLC, siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente. Para la observación, las muestras se montaron en placas 60 μ -Dish con medio de montaje. Se escanearon 4 áreas al azar de cada muestra (un total de 40 campos por grupo) usando un objetivo de inmersión de 40x, step size de 1 μ m y una resolución de 512 \times 512 píxeles. Cada imagen representaba un área de 317 \times 317 μ m. El escaneo se realizó dentro de la estructura de la dentina, a 5-10 μ m del nivel subsuperficial de la dentina para obtener la fluorescencia de las bacterias no afectadas por el procedimiento de corte.

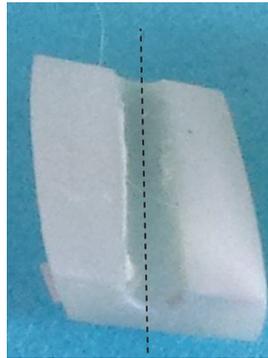


Figura 3.11. Corte vertical por el conducto radicular.

La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el software *bioImage_L*²²⁵. Los parámetros evaluados en cada grupo fueron el biovolumen total (μm^3) y el porcentaje de células muertas (rojas).

Además, cuatro muestras adicionales de cada grupo experimental se contaminaron y se prepararon químico-mecánicamente como se ha explicado anteriormente. Posteriormente, las mitades de los segmentos coronales se sacaron del molde y se prepararon para ser visualizadas al MEB, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para el estudio de los túbulos dentinarios (apartado 3.2.2.2). Finalmente, se tomaron tres microfotografías digitales a 1500x de las paredes del canal de cada muestra, obteniendo un total de 12 campos por grupo. Se cuantificó el número de túbulos con y sin capa de barrillo dentinario y se calculó el porcentaje medio de túbulos limpios (sin barrillo) por grupo.

²²⁵ Chavez 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.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se usaron los softwares Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EEUU) y SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). En todos los casos, se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. A continuación se desarrolla el análisis empleado en cada uno de los ensayos.

3.3.1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS SOLUCIONES PARA ELIMINAR BIOPELÍCULAS CRECIDAS SOBRE SUPERFICIES DE DENTINA

Se calculó la media y el rango del biovolumen total en μm^3 , así como del biovolumen de células vivas.

En el análisis de los biovolúmenes se procedió a contrastar dichas variables con el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Tras confirmar que no siguen una distribución normal se emplearon test no paramétricos. Las comparaciones múltiples de los biovolúmenes totales y de células verdes entre los 4 grupos de estudio y el control (sin y con dentina de forma independiente) se realizaron mediante el test de Kruskal-Wallis. Para comparar los resultados de cada grupo en ausencia y presencia de dentina, se utilizó el test de Mann Whitney.

3.3.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS SOLUCIONES PARA ELIMINAR BIOPELÍCULAS CRECIDAS EN EL INTERIOR DE LOS TÚBULOS DENTINARIOS

Se calculó la media y la desviación estándar del porcentaje de bacterias muertas en el interior de los túbulos dentinarios. Tras aplicar la transformación normalizadora de Anscombe ($\arcsin\sqrt{p}$)²²⁶, las comparaciones entre los porcentajes de cada grupo (sin y con barrillo dentinario de forma independiente) se realizaron mediante el test ANOVA seguido del test Tukey *post hoc*. Para comparar los porcentajes de células muertas dentro de cada grupo de estudio (sin *versus* con barrillo dentinario) se empleó el test *t*-student.

²²⁶ Robert OK. Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis, 2th ed. Pacific Grove, CA: Duxbury; 2000.

3.3.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS SOLUCIONES PARA ELIMINAR BIOPELÍCULAS Y BARRILLO DENTINARIO DE LOS PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN EN EL INTERIOR DE LOS TÚBULOS DENTARIOS DURANTE LA PREPARACIÓN DEL CONDUCTO RADICULAR

Se calculó la media y la desviación estándar del porcentaje de células muertas y del biovolumen total. Los porcentajes de células muertas y biovolúmenes totales se normalizaron mediante la transformación de Anscombe²²⁷ y de Poisson ($\sqrt{x+3/8}$), respectivamente. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante el test ANOVA seguido del test Tukey *post hoc*. Para comparar los porcentajes de túbulos dentinarios libres de barrillo se empleó el test *t*-student.

²²⁷ Robert OK. Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis, 2th ed. Pacific Grove, CA: Duxbury; 2000.

RESULTADOS

Los resultados se han sistematizado en 3 apartados. El primero recoge la validación de la metodología empleada para la infección del sustrato dentinario y la formación de las biopelículas y de la capa de barrillo dentinario. En los siguientes apartados se recogen los resultados de cada uno de los estudios realizados para la consecución de los objetivos.

4.1. VALIDACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA Y LA CAPA DE BARRILLO DENTINARIO

Las imágenes obtenidas mediante MEB confirmaron la formación de las biopelículas en la superficie de los bloques de dentina tras el periodo de incubación (**Figura 4.1., A**). Por otro lado, se confirmó la formación de barrillo dentinario en la superficie de las muestras (**Figura 4.1., B**).

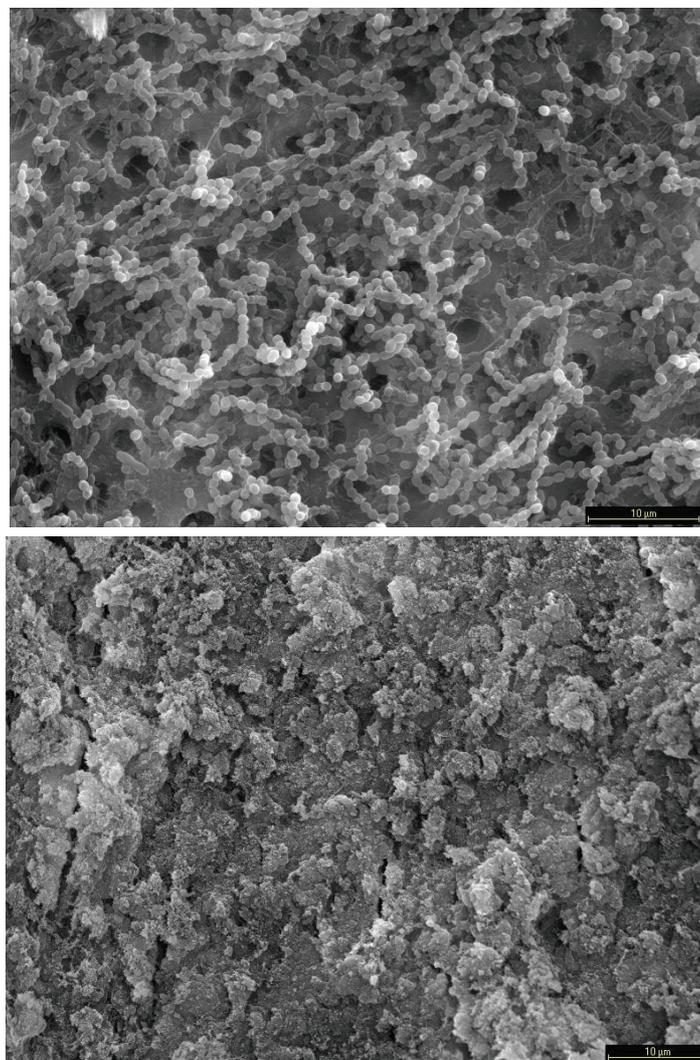


Figura 4.1. A: imagen de MEB representativa de biopelícula de *E. faecalis* crecida sobre la superficie de dentina; **B:** imagen de MEB representativa de la capa de barrillo sobre las paredes del conducto radicular. Barra de escala = 10µm.

4.2. INFLUENCIA DE LOS DETRITOS DE DENTINA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SOLUCIONES DE NaClO SOLAS Y COMBINADAS CON HEBP

4.2.1. DETERMINACIÓN DEL CLORO LIBRE

En la **Figura 4.2.** se muestra la evolución en el tiempo del cloro libre residual de las soluciones de NaClO al 1% y al 2,5% solas o asociadas a HEBP en ausencia y presencia de dentina. En ausencia de dentina, los valores de cloro libre se mantuvieron estables en el tiempo para las soluciones de NaClO al 1 y 2,5%. Cuando se asociaron con HEBP, se observó una ligera disminución a partir de 3 minutos para el NaClO al 1% y de 1 minuto para el NaClO al 2,5%. En presencia de dentina, todas las soluciones perdieron cloro libre, siendo esta pérdida mayor durante el primer 1 minuto, menor entre 1 y 3 y prácticamente inapreciable entre 3 y 10 minutos. Este patrón se cumple para todas las soluciones irrigadoras en presencia de dentina.

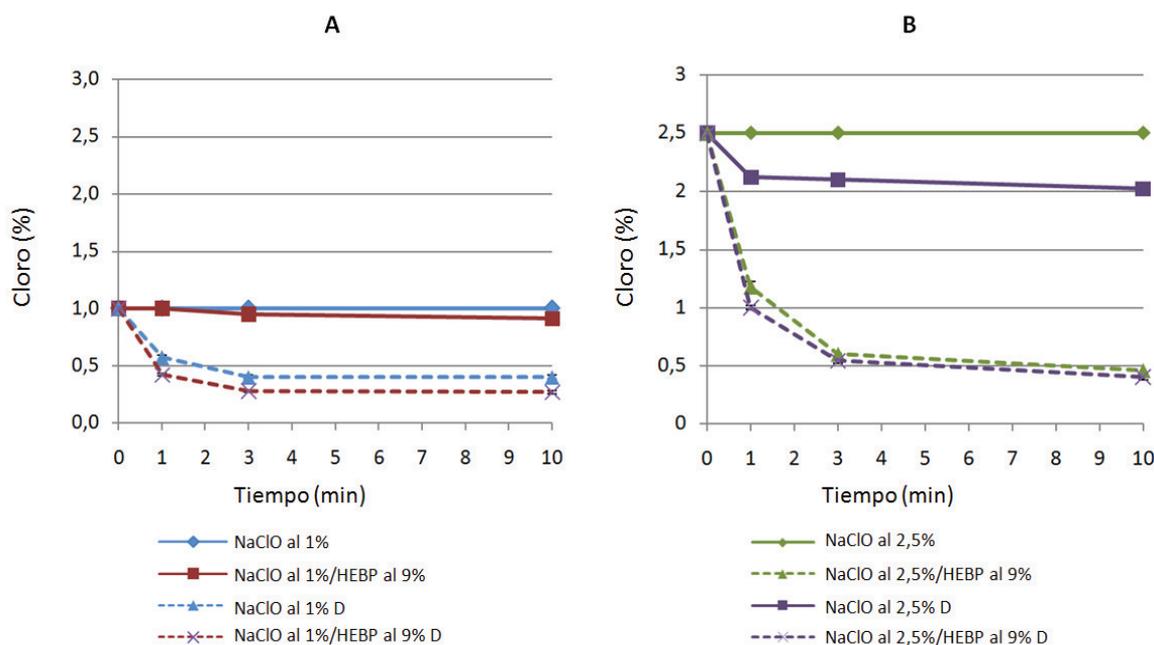


Figura 4.2. Representación gráfica de los resultados del cloro libre basal y tras 1, 3 y 10 minutos de las soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP al 9%, en ausencia y presencia de dentina (D). **A:** NaClO al 1%; **B:** NaClO al 2,5%.

4.2.2. DETERMINACIÓN DEL pH

Los resultados del pH de las soluciones en ausencia y presencia de dentina se muestran en la **Figura 4.3**. En ausencia de dentina, el pH de las soluciones de NaClO al 1% y 2,5% solas o mezcladas con HEBP al 9% se mantuvo constante a lo largo del tiempo. El valor del pH promedio encontrado fue de 12. En presencia de dentina, el pH de las soluciones decreció. Esta disminución fue mayor a lo largo del tiempo en las soluciones de NaClO solas en comparación a las mezcladas con la solución de HEBP.

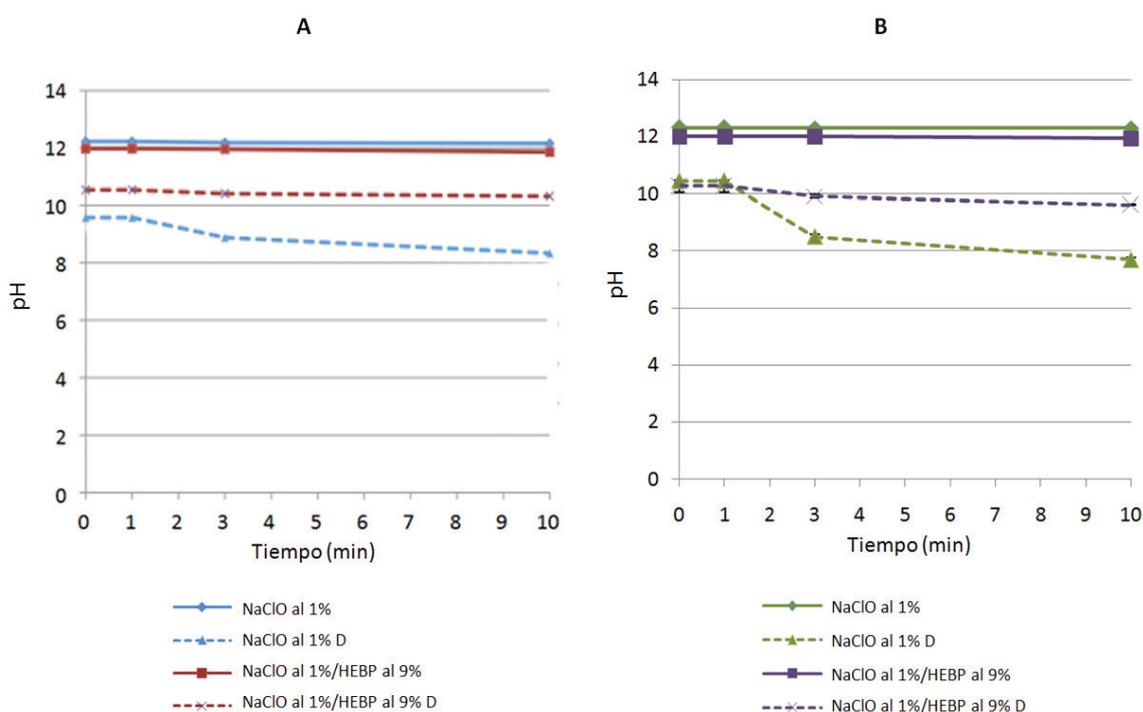


Figura 4.3. Representación gráfica de los resultados de pH basal y tras 1, 3 y 10 minutos de las soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP al 9%, en ausencia y presencia de dentina (D). **A:** NaClO al 1%; **B:** NaClO al 2,5%.

4.2.3. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A BIOPELÍCULAS DE *E. FAECALIS*

Todas las soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP al 9% en ausencia o presencia de polvo de dentina, erradicaron las biopelículas de *E. faecalis* tras 3 minutos de exposición. Los controles positivos dieron recuentos de $1,35 \times 10^5 \pm 8,97 \times 10^4$ UFC/ml (media \pm desviación estándar). No se observó crecimiento bacteriano en los controles negativos.

4.2.4. EVALUACIÓN *EX VIVO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES FRENTE A BIOPELÍCULAS DE *E. FAECALIS* SOBRE SUPERFICIES DE DENTINA

Los resultados del biovolumen total y del biovolumen de células vivas (verdes) de las biopelículas de *E. faecalis* tras ser expuestas a las soluciones durante 3 minutos se muestran en la **Tabla 4.1**. Todas las soluciones irrigadoras fueron efectivas en disminuir el biovolumen total y el de células verdes en comparación con el control ($p < 0,05$) a excepción de NaClO al 1% que perdió su actividad en presencia de dentina. El polvo de dentina también tuvo un efecto negativo en la acción antibiofilm del resto de las soluciones irrigadoras, de tal forma que los biovolúmenes obtenidos fueron significativamente mayores en presencia de dentina. La excepción fue NaClO al 2,5%/HEBP al 9% que no se vio afectada por el polvo de dentina. Los biovolúmenes de los controles positivos no se modificaron por la presencia de dentina.

Imágenes representativas de las biopelículas tratadas se muestran en la **Figura 4.4. y 4.5**.

Tabla 4.1. Media (rango) del biovolumen total y biovolumen de células vivas (μm^3) de las biopelículas de *E. faecalis* tras ser expuestas a las soluciones irrigadoras durante 3 minutos en ausencia y presencia de polvo de dentina.

	Biovolumen total		Biovolumen células vivas	
	Sin polvo de dentina	Con polvo de dentina	Sin polvo de dentina	Con polvo de dentina
Control	$3,54 \times 10^4$ a,1 ($1,62 \times 10^4 - 1,18 \times 10^5$)	$3,6 \times 10^4$ a,1 ($1,9 \times 10^4 - 6,3 \times 10^4$)	$2,8 \times 10^4$ a,1 ($1,3 \times 10^4 - 9,6 \times 10^4$)	$3,2 \times 10^4$ a,1 ($1,7 \times 10^4 - 6,0 \times 10^4$)
NaClO al 1%	$9,8 \times 10^2$ b,c,1 ($1,15 \times 10^2 - 5,3 \times 10^3$)	$2,0 \times 10^4$ a,b,2 ($5,8 \times 10^2 - 5,2 \times 10^4$)	$3,4 \times 10^1$ b,1 ($0 - 4,1 \times 10^3$)	$1,9 \times 10^3$ a,2 ($1,7 \times 10^2 - 2,0 \times 10^4$)
NaClO al 1%/HEBP al 9%	$2,5 \times 10^2$ c,1 ($20 \times 10^1 - 1,0 \times 10^3$)	$2,5 \times 10^3$ c,d,2 ($1,7 \times 10^2 - 1,9 \times 10^4$)	$6,5 \times 10^1$ b,1 ($1 - 5,3 \times 10^2$)	$1,9 \times 10^2$ b,2 ($3,6 \times 10^1 - 9,6 \times 10^2$)
NaClO al 2,5%	$2,1 \times 10^2$ c,1 ($2,4 \times 10^1 - 4,3 \times 10^3$)	$1,9 \times 10^3$ c,d,2 ($1,1 \times 10^2 - 9,3 \times 10^3$)	$1,3 \times 10^1$ b,1 ($0 - 9,5 \times 10^1$)	$1,1 \times 10^2$ b,2 ($6 - 1,5 \times 10^3$)
NaClO al 2,5%/HEBP al 9%	$5,2 \times 10^2$ c,1 ($3,1 \times 10^1 - 2,3 \times 10^3$)	$2,2 \times 10^2$ d,1 ($1,6 \times 10^1 - 2,3 \times 10^3$)	$8,1 \times 10^1$ b,1 ($1,2 \times 10^1 - 1,6 \times 10^3$)	$4,5 \times 10^1$ b,1 ($0 - 1,6 \times 10^3$)
HEBP al 9%	$3,5 \times 10^3$ b,1 ($1,2 \times 10^3 - 8,1 \times 10^3$)	$4,9 \times 10^3$ b,c,1 ($1,2 \times 10^3 - 9,0 \times 10^3$)	$2,2 \times 10^3$ a,1 ($5,5 \times 10^2 - 9,7 \times 10^3$)	$2,3 \times 10^3$ a,1 ($4,3 \times 10^2 - 6,0 \times 10^3$)

NaClO: hipoclorito de sodio.

HEBP: ácido etidróico.

Leído verticalmente, las mismas letras muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas determinado por el test de Kruskal-Wallis.

Leído horizontalmente, los mismos números muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas determinado por el test de Mann Whitney.

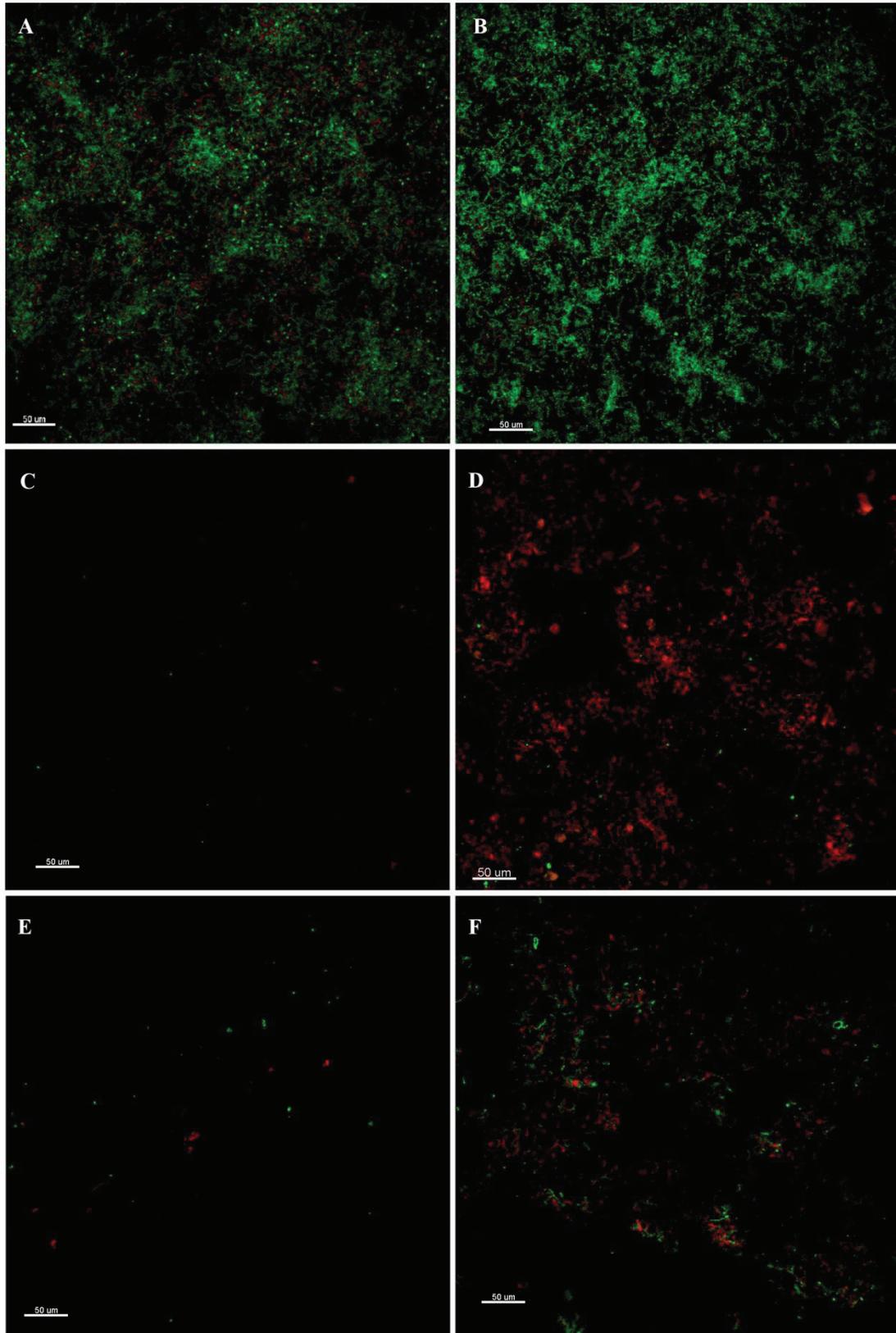


Figura 4.4. Imágenes de MLC representativas de biopelículas de *E. faecalis* tras ser tratadas con las soluciones. **A:** control positivo sin dentina; **B:** control positivo con dentina; **C:** NaClO al 1% sin dentina; **D:** NaClO al 1% con dentina; **E:** NaClO al 1%/HEBP sin dentina; **F:** NaClO al 1%/ HEBP con dentina. Barra de escala = 50μm.

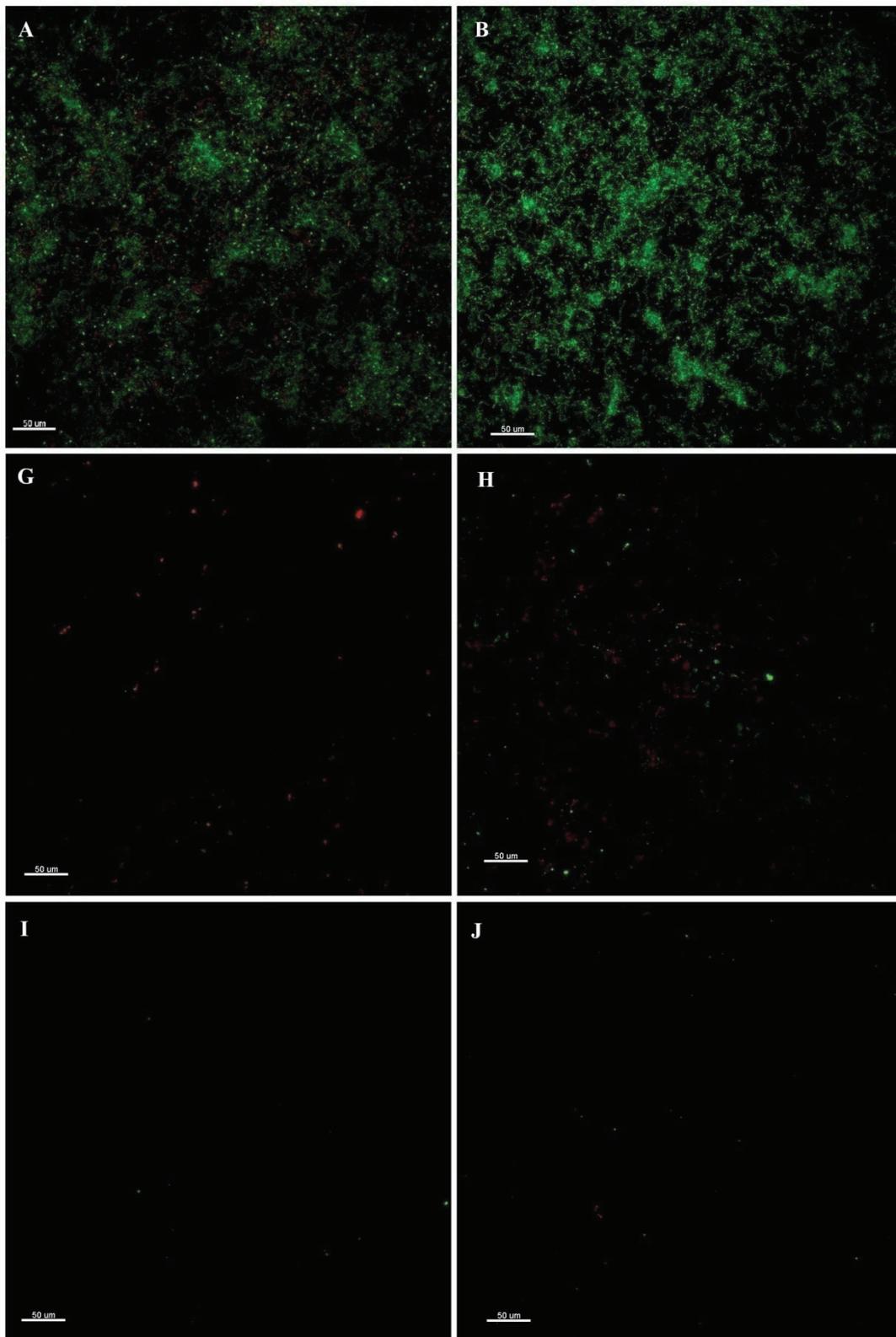


Figura 4.5. Imágenes de MLC representativas de biopelículas de *E. faecalis* tras ser tratadas con las soluciones. **A:** control positivo sin dentina; **B:** control positivo con dentina; **C:** NaClO al 2,5% sin dentina; **D:** NaClO al 2,5% con dentina; **E:** NaClO al 2,5% + HEBP sin dentina; **F:** NaClO al 2,5%/HEBP al 9% con dentina. Barra de escala = 50μm.

4.3. EVALUACIÓN *EX VIVO* DE LA INFLUENCIA DEL BARRILLO DENTINARIO EN LA ACTIVIDAD DE LAS SOLUCIONES DE NaClO SOLAS Y COMBINADAS CON HEBP

4.3.1. EVALUACIÓN *EX VIVO* DE LA INFLUENCIA DEL BARRILLO DENTINARIO EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES FRENTE A *E. FAECALIS* EN EL INTERIOR DE LOS TÚBULOS DENTINARIOS

Los resultados del porcentaje de células muertas en el interior de los túbulos dentinarios se muestran en la **Tabla 4.2**. Todas las soluciones de NaClO ejercieron una actividad antimicrobiana frente a las bacterias del interior de los túbulos dentinarios. Además, no se encontraron diferencias significativas entre la actividad del NaClO al 2,5% y NaClO al 2,5%/HEBP al 9% en ausencia de barrillo dentinario. Por el contrario, la presencia de barrillo redujo significativamente la acción antimicrobiana del NaClO al 2,5% en comparación con la solución de NaClO al 2,5%/HEBP al 9%, la cual no se vio afectada.

En la **Figura 4.6**. se muestran imágenes representativas de la dentina infectada, tratada con NaClO al 2,5% solo y en combinación con HEBP al 9%, en presencia de barrillo dentinario. La contaminación y penetración de las bacterias en el interior de los túbulos dentinarios fue confirmada a través de MLC, donde se observó una infección homogénea de *E. faecalis* en los túbulos dentinarios con una penetración bacteriana de alrededor de 200 µm desde el lado del canal hacia la dentina (**Figura 4.6., A**).

Tabla 4.2. Media (desviación estándar) del porcentaje de células muertas en el interior de los túbulos dentinarios tras ser expuestas a una solución de NaClO al 2,5%, sola y combinada con HEBP 9% en ausencia y presencia de barrillo dentinario.

	Ausencia de barrillo dentinario	Presencia de barrillo dentinario
Control	22,45 (11,85) ^{2,a}	29,15 (9,33) ^{3,a}
NaClO 2,5%	76,11 (13,63) ^{1,a}	42,20 (13,20) ^{1,b}
NaClO 2,5%/HEBP 9%	68,86 (17,51) ^{1,a}	69,75 (14,90) ^{2,a}

Leído verticalmente, los mismos números muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas determinado por el test de Tukey, después de que una ANOVA mostrara valores significativos.

Leído horizontalmente, las mismas letras muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas determinado por el test *t*-Student.

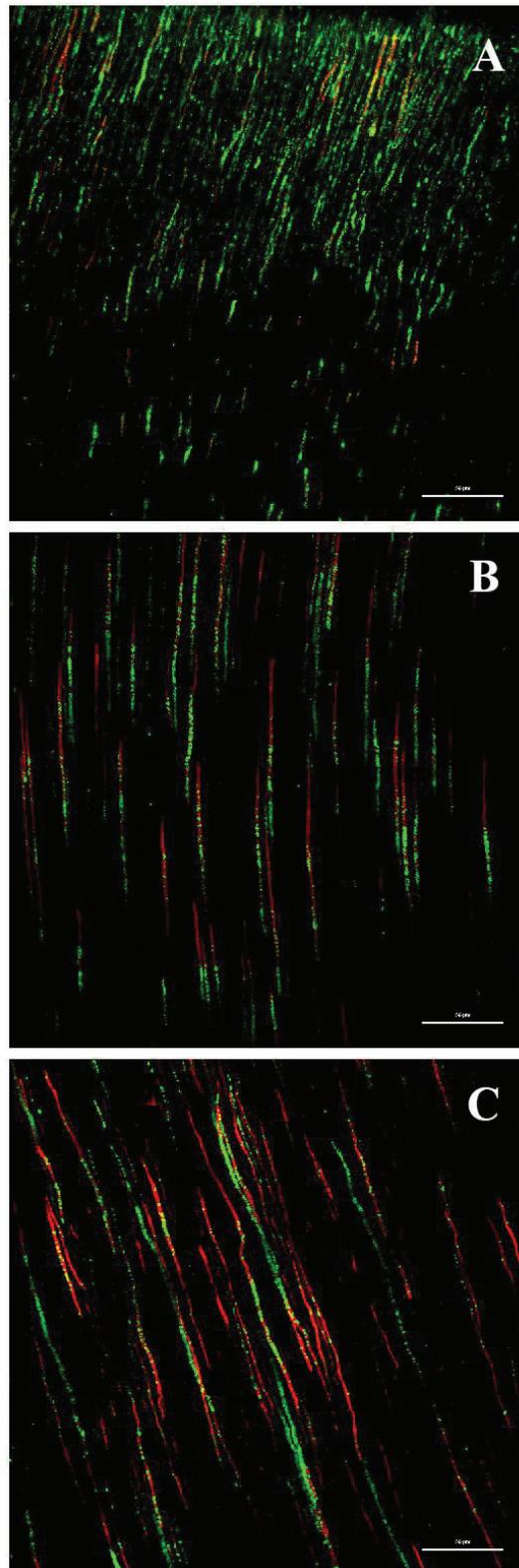


Figura 4.6. Imágenes de MLC representativas de túbulos dentinarios infectados tras ser tratados con **A:** agua destilada; **B:** NaClO 2,5% y **C:** NaClO al 2,5%/HEBP al 9% en presencia de barrillo dentinario. Barra de escala = 50 μ m.

4.3.2. DETERMINACIÓN EX VIVO DE LA CAPACIDAD DE LAS SOLUCIONES PARA ELIMINAR EL BARRILLO DENTINARIO

En los grupos control y tratado con NaClO no se observaron túbulos dentinarios libres de barrillo, estando la superficie completamente cubierta por una capa de barrillo. Sin embargo, en el grupo de NaClO al 2,5%/HEBP al 9%, el 95,40% \pm 3,63 de los túbulos estaban libres de barrillo dentinario (**Figura 4.7.**).

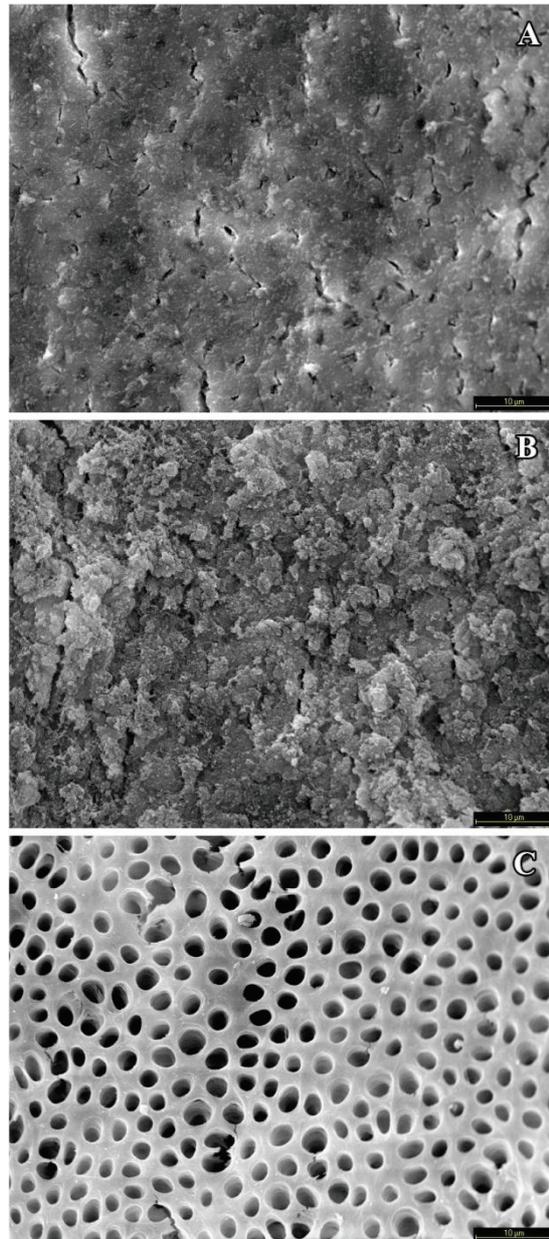


Figura 4.7. Imágenes de MEB representativas de túbulos dentinarios infectados tras ser tratados con **A:** agua destilada; **B:** NaClO al 2,5% y **C:** NaClO al 2,5%/HEBP al 9% en presencia de barrillo dentinario. Barra de escala = 50µm.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y DE ELIMINAR EL BARRILLO DENTINARIO DE DISTINTOS PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN DURANTE LA PREPARACIÓN QUÍMICO-MECÁNICA.

Los resultados de la infección por *E. faecalis* en el interior de los túbulos dentinarios se observan en la **Tabla 4.3**. La comparación global media realizada con ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos, tanto en el biovolumen total como en el porcentaje de células muertas ($p < 0,001$ en ambos casos). Los protocolos de irrigación que incluyeron NaClO (NaClO, NaClO/HEBP y NaClO + EDTA), ejercieron la mayor actividad antimicrobiana, sin diferencias significativas en sus porcentajes de muerte. Sin embargo, cuando se usó agua como solución de irrigación, se observó una reducción significativa de la viabilidad bacteriana en comparación con el grupo control, aunque ésta fue significativamente menor que los grupos que incluyeron NaClO.

En cuanto al biovolumen total, todos los protocolos de irrigación, incluido el agua, redujeron significativamente las bacterias sin diferencias estadísticas entre ellas. Esta reducción fue significativa con respecto al grupo de control, que no fue instrumentado ni irrigado. Imágenes representativas del MLC se muestran en la **Figura 4.8**.

Tabla 4.3. Media (desviación estándar) del porcentaje de células muertas y del biovolumen total (μm^3) de bacterias en el interior de los túbulos dentinarios tras la preparación químico-mecánica irrigando con agua, NaClO al 2,5%, NaClO al 2,5% mezclado con HEBP al 9% y NaClO al 2,5% seguido de EDTA al 17%.

	Células muertas*(%)	Biovolumen total**(μm^3)
Control	20,75 (13,85) ^a	3606,18 (3234,95) ^a
Agua	31,96 (18,07) ^b	1517,73 (981,80) ^b
NaClO 2,5%	72,52 (16,99) ^c	1461,40 (1593,89) ^b
NaClO 2,5%/HEBP 9%	70,69 (17,13) ^c	1344,68 (1615,09) ^b
NaClO 2,5% + EDTA 17%	79,86 (14,62) ^c	940,30 (943,84) ^b

Control: control positivo, no instrumentado y no irrigado.

Leído verticalmente, las mismas letras muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas determinado por el test de Tukey, datos previamente sometidos a Anscombe ($\arcsin\sqrt{p}$)* y Poisson** ($\sqrt{x+3/8}$).

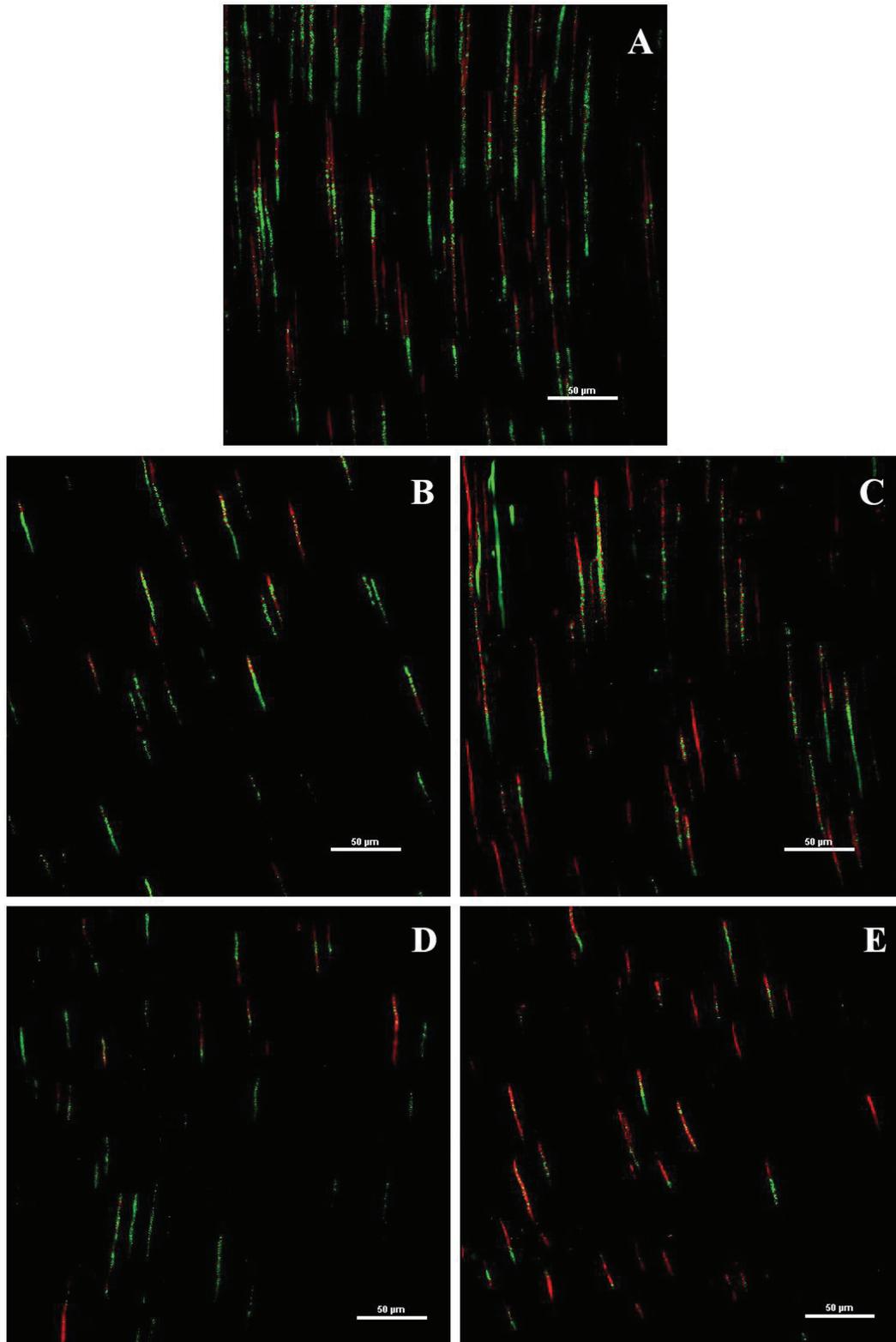


Figura 4.8. Imágenes representativas tomadas con MLC del **A:** control positivo y de los grupos irrigados con **B:** agua destilada; **C:** NaClO al 2,5%; **D:** NaClO al 2,5%/HEBP al 9% y **E:** NaClO al 2,5% + EDTA al 17%. Barra de escala = 50 µm.

En el estudio del barrillo dentinario, no se observaron túbulos dentinarios sin barrillo en los grupos control y NaClO al 2,5%. Sin embargo, el grupo tratado con NaClO al 2,5%/HEBP al 9% mostró un $90,41\% \pm 7,33$ de los túbulos dentinarios libres de barrillo y el grupo NaClO al 2,5% + EDTA al 17% mostró un $76,54\% \pm 15,30$ de túbulos libres de barrillo, habiendo entre ellos una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,01$). En la **Figura 4.9.** se muestran imágenes representativas de cada grupo. En la **Figura 4.10.** se muestran con más detalle túbulos dentinarios con y sin barrillo dentinario.

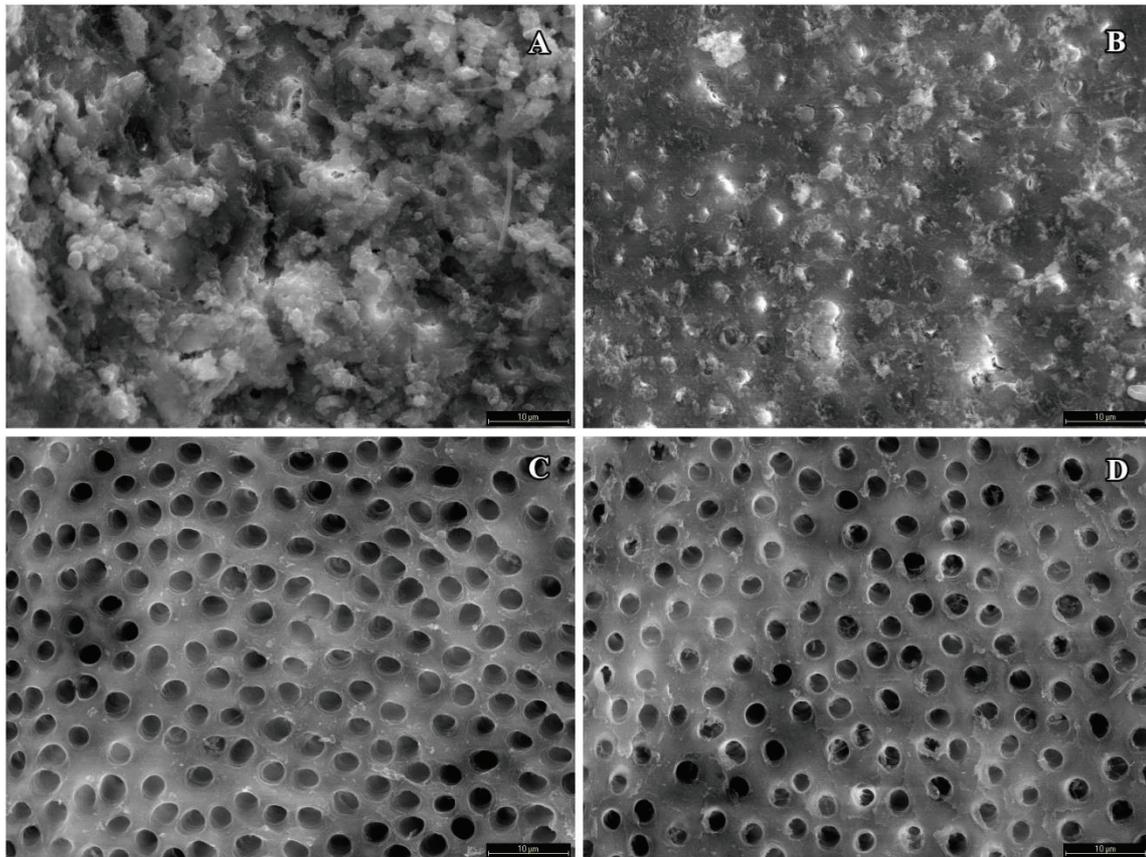


Figura 4.9. Imágenes representativas tomadas con MEB a 1500x, tras el tratamiento con **A:** agua destilada; **B:** NaClO al 2,5%; **C:** NaClO al 2,5%/HEBP al 9% y **D:** NaClO al 2,5% + EDTA al 17%. Barra de escala = 10µm.

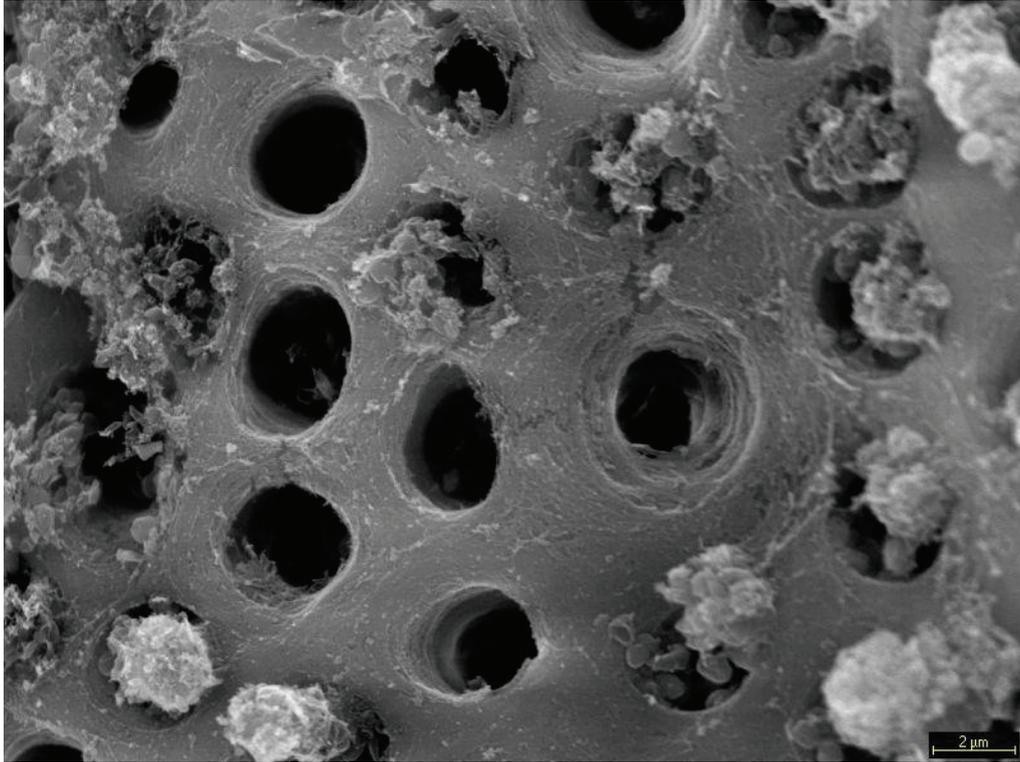


Figura 4.10. Imagen de MEB en la que se muestran con detalle túbulos dentinarios con y sin barrillo dentinario contaminado. Barra de escala = 2μm.

DISCUSIÓN

5.1. VALIDEZ INTERNA DEL ESTUDIO

En este estudio se ha empleado la bacteria *E. faecalis* por estar altamente implicada en las infecciones endodónticas persistentes, en ocasiones en mono infección^{228,229,230,231}. Esto es debido entre otros motivos, a que presenta una amplia variedad de polimorfismos genéticos²³², produce proteínas que le ayudan a adherirse a la dentina²³³, es capaz de sobrevivir periodos largos de escasez de nutrientes utilizando el suero como fuente de alimento²³⁴ y es capaz de resistir la medicación intraconducto con hidróxido de calcio^{235,236,237}. *E. faecalis* se aísla tanto en las paredes del sistema de conductos radiculares como en el interior de los túbulos dentinarios, siendo capaz de penetrar una profundidad de 300-400 μm ²³⁸. Otra de las razones por las que la hemos seleccionado es que es un microorganismo idóneo para infectar los túbulos dentarios^{239,240} ya que es capaz de sobrevivir a las centrifugaciones²⁴¹ a las que se somete sin que haya una reducción significativa del número (comprobado en ensayo piloto).

La solución de hipoclorito de sodio se seleccionó por ser el irrigante más empleado durante la preparación químico-mecánica gracias a su efecto biológico, que incluye una importante acción antimicrobiana y de disolución de materia orgánica^{242,243,244}. Debe emplearse junto a soluciones

²²⁸ Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.

²²⁹ Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

²³⁰ Engström B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy.* 1964;15:87-106.

²³¹ Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.

²³² Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:95-101.

²³³ Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:121-6.

²³⁴ Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234-9.

²³⁵ Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142-9.

²³⁶ Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.

²³⁷ Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221-8.

²³⁸ Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6:142-9.

²³⁹ Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentine wall in vitro. *J Dent Res* 1982;61:435-8.

²⁴⁰ Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6:142-9.

²⁴¹ 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.

²⁴² Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35-40.

²⁴³ McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147-79.

ácidas o quelantes para eliminar el barrillo dentinario y los detritus de dentina que se generan con la instrumentación. En este trabajo se ha empleado el HEBP, un quelante débil²⁴⁵ del que se ha demostrado su capacidad para eliminar el barrillo dentinario de forma similar al EDTA y de reducir el acúmulo de detritus de dentina generados durante la instrumentación^{246,247,248}. El HEBP se ha propuesto para ser utilizado en combinación con NaClO, siendo la combinación NaClO/HEBP una solución irrigadora única que se emplea durante y al final de la preparación químico-mecánica, por respetar las propiedades de ambas soluciones por separado^{249,250,251,252}. Sin embargo, poca información existía sobre la acción antimicrobiana de la solución combinada, y sobre el efecto inhibitor de los detritus de dentina y del barrillo dentinario en la acción de dicha solución.

En este estudio se incluyeron 3 Objetivos. Los dos primeros buscan evaluar el efecto de los detritus de dentina y del barrillo dentinario en la actividad antimicrobiana de las soluciones de NaClO solo y combinado con HEBP. Como sustrato para el crecimiento de las bacterias, se emplearon bloques de dentina que se infectaron y que, posteriormente, se expusieron a las soluciones irrigadoras. Concretamente, para evaluar el efecto de los detritus de dentina en la actividad de las soluciones (Objetivo 1), se usaron bloques de dentina o unidades volumétricas de dentina (UVD), en cuya superficie crecieron las biopelículas de *E. faecalis*. Esta técnica fue descrita por Baca *et al.* (2011)²⁵³ y posteriormente modificada por Arias-Moliz *et al.* (2014)²⁵⁴. Ofrece diversas ventajas como que los bloques de dentina son fácilmente estandarizados e infectados y, que de cada diente se pueden obtener varios bloques que son distribuidos

²⁴⁴ Tejada S, Baca P, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT. Influence of dentine debris and organic tissue on the properties of sodium hypochlorite solutions. *Int Endod J* 2019;52:114-122.

²⁴⁵ De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J Jr, Paciornik S. Longitudinal co-site optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. *J Endod* 2008;34:71-5.

²⁴⁶ De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J Jr, Paciornik S. Longitudinal co-site optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. *J Endod* 2008;34:71-5.

²⁴⁷ Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J* 2009;42:335-43.

²⁴⁸ Yadav HK, Yadav RK, Chandra A, Tikku AP. A Scanning Electron Microscopic Evaluation of the Effectiveness of Etidronic Acid, SmearClear and MTAD in Removing the Intracanal Smear Layer. *J Dent (Shiraz)* 2017;18:118-126

²⁴⁹ Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20.

²⁵⁰ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, Monteiro Bramante C, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 2015;48:1188-93.

²⁵¹ Tartari T, Guimarães BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA, Bramante CM. Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *Int Endod J* 2015;48:399-404.

²⁵² Biel P, Mohn D, Attin T, Zehnder M. Interactions between the Tetrasodium Salts of EDTA and 1-Hydroxyethane 1,1-Diphosphonic Acid with Sodium Hypochlorite Irrigants. *J Endod* 2017;43:657-661.

²⁵³ 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.

²⁵⁴ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, Monteiro Bramante C, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 2015;48:1188-93.

aleatoriamente entre los grupos de estudio, lo que disminuye la variabilidad inherente de la muestra²⁵⁵.

Para simular los detritus de dentina se ha utilizado polvo de dentina radicular de forma similar a como se realizó previamente²⁵⁶. El polvo de dentina tiene la ventaja de que puede añadirse en cantidades conocidas, facilitando el control de su mezcla con los diferentes agentes antisépticos y con los microorganismos. En este estudio se empleó polvo de dentina de un tamaño de partícula pequeño, < 190 µm.

La efectividad de las soluciones irrigadoras se probó inicialmente *in vitro* utilizando el dispositivo MBEC™ HTP con el objetivo de tener una información previa de su acción en presencia o no de dentina. Dicho dispositivo se ha empleado previamente para llevar a cabo estudios sobre la susceptibilidad de biopelículas microbianas a antibióticos²⁵⁷, desinfectantes y metales^{258,259}. El flujo que origina el movimiento del agitador de balanceo con el caldo bacteriano facilita la formación simultánea de 96 biopelículas que han demostrado ser estadísticamente equivalentes^{260,261,262}. De este modo, se pueden testar varios agentes antimicrobianos y concentraciones en un mismo ensayo consiguiéndose resultados muy válidos²⁶³. Es, por tanto, un método rápido, fiable y que permite controlar múltiples variables a la vez, tales como medios de cultivo, concentración de agentes y tiempo de exposición.

Por otro lado, también se evaluó la influencia del polvo de dentina en el cloro libre y el pH de las soluciones de NaClO a lo largo del tiempo. Esto se realizó porque la actividad biológica del NaClO depende de ambos factores y conocerlos puede ayudar a comprender los cambios en la actividad antimicrobiana de las soluciones en contacto con la dentina. El cloro libre disponible

²⁵⁵ 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.

²⁵⁶ Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *Int Endod J* 2000;33:126-31.

²⁵⁷ Anderson TF. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans NY Acad Sci* 1951;13:130-3.

²⁵⁸ Harrison JJ, Ceri H, Stremick C, Turner RJ. Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ Microbiol* 2004;6:1220-7.

²⁵⁹ Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol* 2005;5:53.

²⁶⁰ 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.

²⁶¹ Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol* 2005;5:53.

²⁶² 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.

²⁶³ 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.

consiste en HClO y ClO⁻²⁶⁴. El primero tiene un potente efecto bactericida debido a su pequeño tamaño el cual le permite penetrar fácilmente en las membranas de las bacterias, siendo predominante en soluciones ácidas; el segundo se relaciona con la capacidad de disolución de materia orgánica y prevalece en condiciones alcalinas^{265,266}. Por otro lado, la presencia de dentina favorece la pérdida de cloro libre y la disminución del pH de las soluciones²⁶⁷. Esta reducción de pH con el tiempo puede explicar por qué las soluciones en presencia de dentina pierden capacidad para disolver las biopelículas. A medida que disminuye el pH hay predominio de HClO sobre ClO⁻ y, por tanto, disminuye la capacidad de disolución. Sin embargo, el efecto antimicrobiano no se ha visto tan alterado por esta reducción de pH.

Para el estudio del efecto del barrillo dentinario en las soluciones (Objetivo 2) se empleó el método de infección de túbulos dentinarios^{268,269}. En él, se obtuvieron bloques de dentina radicular de 4 mm que se contaminaron con una suspensión de *E. faecalis* con la ayuda de centrifugaciones. Este método permite una contaminación artificial y reproducible de los túbulos dentinarios que facilita la comparación de resultados. Por otro lado, para crear la capa de barrillo dentinario que se produce con la instrumentación, se utilizó una lima rotatoria sobre las paredes del conducto radicular.

El Objetivo 3 persigue evaluar la acción de la preparación químico-mecánica empleando distintos protocolos de irrigación, sobre las bacterias que infectan los túbulos dentinarios. Este último objetivo se ha incluido para obtener resultados que se aproximen más a la situación *in vivo* ya que incluye una raíz completa y volúmenes de soluciones y tiempos de trabajo similares a los que se usan en la clínica. La evaluación de la acción antimicrobiana se realizó en los segmentos coronales de 4 mm puesto que son más fácilmente infectados mediante centrifugación y el número de túbulos dentinarios es mayor a este nivel en comparación con el resto de la raíz. Sin embargo, se mantuvo el resto de la raíz para poder realizar la preparación químico-mecánica a todo el conducto radicular. Por otro lado, para la manipulación de las raíces se fabricó un molde

²⁶⁴ Baker RW. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins: 1. Physico-chemical study of the course of the reaction. *Biochem J* 1947;41:337-42.

²⁶⁵ Winter J, Ilbert M, Graf PC, Ozcelik D, Jakob U. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* 2008;135:691-701.

²⁶⁶ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, Monteiro Bramante C, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J*. 2015;48:1188-93.

²⁶⁷ Tejada S, Baca P, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT. Influence of dentine debris and organic tissue on the properties of sodiumhypochlorite solutions. *Int Endod J* 2019;52:114-122.

²⁶⁸ 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.

²⁶⁹ 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.

de polivinilsiloxano de cada una lo que facilitó el ensamblaje de los segmentos radiculares y la instrumentación de las mismas.

Tradicionalmente, el estudio de la microbiota endodóntica se ha llevado a cabo mediante técnicas básicas como la siembra en medios de cultivo y su posterior recuento²⁷⁰. No obstante, 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 de aquellas especies que también están presentes pero en un estado latente o viable pero no cultivable. Las bacterias en estado viable pero no cultivable presentan niveles muy bajos de actividad metabólica pero están vivas y son capaces de reactivarse si las condiciones del medio vuelven a ser favorables²⁷¹. Hay diversas causas que favorecen que las bacterias entren en ese estado; una de ellas es estar sometidas a condiciones de estrés ambiental. Ésto, junto con el crecimiento en forma de biopelículas en las enfermedades infecciosas, ha creado la necesidad de desarrollar nuevas técnicas para el estudio de las bacterias en las infecciones, entre ellas la endodóntica. Una de estas técnicas es el empleo del microscopio láser confocal (MLC) junto con fluorocromos de viabilidad, que permiten la visualización, cuantificación y el estudio de la viabilidad de las bacterias en su estado fisiológico.

La microscopía láser confocal es una técnica microscópica de fluorescencia que presenta grandes ventajas frente a la microscopía óptica tradicional. Entre ellas podemos destacar que presenta una mayor resolución, da la posibilidad de realizar secciones ópticas (el sistema es capaz de tomar imágenes a diferente profundidad), ofrece un mayor contraste debido a que elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco, permite la reconstrucción 3D de las estructuras a partir de las secciones ópticas y facilita el análisis de las imágenes obtenidas mediante diferentes softwares²⁷².

En este trabajo se han empleado los fluorocromos Syto-9 y PI, del kit de viabilidad Live/Dead. Ambos tiñen los ácidos nucleicos discriminando las células viables de las muertas en base a la integridad de la membrana. Syto-9 es una molécula pequeña que atraviesa las membranas permeables y, cuando es excitada, emite una fluorescencia verde. PI es una molécula que es

²⁷⁰ 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.

²⁷¹ 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.

²⁷² 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.

impermeable a la membrana y no atraviesa las membranas intactas, por lo que solo se fija al ADN de bacterias con membranas dañadas emitiendo una fluorescencia roja al ser excitado. Por otro lado, IP tiene más afinidad por los ácidos nucleicos que Syto-9 y, por ello, cuando ambos fluorocromos están presentes en una célula, Syto-9 es desplazado de los ácidos nucleicos por IP y la célula se tiñe con fluorescencia roja^{273,274}.

El empleo de los fluorocromos unidos a la microscopía confocal permite el análisis *in situ* de las biopelículas sin alterar su estructura. Con esta técnica, en este estudio hemos evaluado dos parámetros, la viabilidad y el biovolumen de células unidas a la dentina^{275,276}. Hay que resaltar el interés en conocer los cambios en el biovolumen tras el tratamiento con NaClO, el cual es un desorganizador de materia orgánica incluyendo las biopelículas. De cada muestra se han analizado 4 campos tridimensionales o *stacks*, que consideramos representativos de cada grupo experimental.

A pesar de las ventajas, esta técnica tiene ciertas limitaciones. La más importante hace referencia a los falsos negativos que se obtienen con aquellas bacterias que tienen membranas dañadas pero que pueden reanimarse si las condiciones del medio vuelven a ser favorables²⁷⁷. Estas células se tiñen de rojo debido a alteración de la integridad de sus membranas^{278,279,280}. A pesar de esta desventaja, el análisis de al menos dos parámetros, biovolumen total y porcentaje de células con membranas intactas (vivas) o dañadas (muertas), permite obtener una mejor comprensión de la actividad antimicrobiana de las soluciones. A pesar de que la denominación correcta es células con membranas intactas o dañadas, en este trabajo se han utilizado los términos células vivas o muertas, respectivamente.

²⁷³ Molecular probes: Product information LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability Kit. 2001.

²⁷⁴ Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 1999;37:77-86.

²⁷⁵ Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *Journal of Endodontics* 2010;36:1820-3.

²⁷⁶ 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.

²⁷⁷ 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.

²⁷⁸ Kaprelyants AS, Kell DB. Rapid assessment of bacterial viability and vitality using rhodamine 123 and flow cytometry. *J Appl Bacteriol.* 1992;72:410-422.

²⁷⁹ Kaprelyants AS, Gottschal JC, Kell DB. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993;10:271-85.

²⁸⁰ Shi L, Günther S, Hübschmann T, Wick LY, Harms H, Müller S. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry A* 2007;71:592-8.

Finalmente, para el análisis de las imágenes obtenidas en el MLC, se ha empleado el software *bioImage_L*²⁸¹.

Para el estudio de la capacidad de las soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP para eliminar el barrillo dentinario, se utilizó la microscopía electrónica de barrido (MEB). El MEB es una técnica de caracterización superficial no destructiva que proporciona información morfológica y química de los materiales. Un haz de electrones incide sobre la muestra previamente preparada y recubierta con una fina capa de oro o carbono, que le otorga propiedades conductoras. Entre sus ventajas encontramos que tiene un amplio rango de ampliación (de 20x hasta más de 30.000x) y puede diferenciar materiales. Entre sus limitaciones tenemos que los electrones recorren la superficie por lo que sólo podemos obtener imágenes de la superficie²⁸². A pesar de esto, el MEB es una herramienta adecuada para evaluar el barrillo dentinario y observar el efecto que tienen los irrigantes en la superficie de la dentina y conducto radicular^{283,284,285,286}.

5.2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS DETRITOS DE DENTINA EN EL CLORO LIBRE, PH Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* Y *EX VIVO* DE LAS SOLUCIONES

A pesar de la reconocida actividad antimicrobiana de NaClO *in vitro*^{287,288,289,290,291,292}, su eficacia disminuye cuando es aplicado en el conducto radicular^{293,294}. Esta disminución de actividad del

²⁸¹ 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.

²⁸² Savage JC, Picard K, González-Ibáñez F, Tremblay MÈ. A Brief History of Microglial Ultrastructure: Distinctive Features, Phenotypes, and Functions Discovered Over the Past 60 Years by Electron Microscopy. *Front Immunol* 2018;25:9-803.

²⁸³ Prabhu SG, Rahim N, Bhat KS, Mathew J. Comparison of removal of endodontic smear layer using NaOCl, EDTA and different concentrations of maleic acid A SEM study. *Endodontology* 2003;15:20–5.

²⁸⁴ Ballal NV, Kandian S, Mala K, Bhat KS, Acharya S. Comparison of the efficacy of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid in smear layer removal from instrumented human root canal: A scanning electron microscopic study. *J Endod* 2009;35:1573–6.

²⁸⁵ Wong DT, Cheung GS. Extension of bactericidal effect of sodium hypochlorite into dentinal tubules. *J Endod* 2014;40:825-9.

²⁸⁶ Kuruvilla A, Jaganath BM, Krishnegowda SC, Ramachandra PK, Johns DA, Abraham A. A comparative evaluation of smear layer removal by using EDTA, etidronic acid, and maleic acid as root canal irrigants: An *in vitro* scanning electron microscopic study. *J Conserv Dent* 2015;18:247-51.

²⁸⁷ 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.

²⁸⁸ 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.

²⁸⁹ Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39:878-85.

²⁹⁰ Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Braz Dent J* 2003;14:99-102.

²⁹¹ 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.

²⁹² 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.

²⁹³ Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35-40.

²⁹⁴ Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000;26:751-5.

NaClO *in vivo* puede atribuirse a su dificultad para alcanzar las áreas complejas del conducto, así como a su interacción con el contenido del conducto radicular que incluye una mezcla de productos orgánicos e inorgánicos, como pulpa, detritus de dentina y biopelículas bacterianas. En este estudio se evaluó el efecto inhibitor de los detritus de dentina en la actividad química y biológica de NaClO solo y en combinación con HEBP.

Los resultados de este trabajo indican que el NaClO reacciona progresivamente con la dentina a lo largo del tiempo. De esta forma, el cloro disponible y el pH se redujeron significativamente durante el primer minuto en todas las soluciones, siendo dicha reducción menor a partir de 1 minuto de contacto con el polvo de dentina. Camps *et al.* (2009)²⁹⁵ mostraron que el cloro de la solución de NaClO al 2,5% se redujo a un 1,38% después de 10 minutos en presencia de materia orgánica, lo cual es un porcentaje más alto que el 0,5% encontrado en este estudio tras estar en contacto con el polvo de dentina. Por otro lado, Macedo *et al.* (2010)²⁹⁶ observaron una reducción significativa del cloro disponible del 2% al 1,65% después de 1 minuto de contacto con las paredes del conducto radicular. Es difícil comparar los resultados de estos estudios con los obtenidos en el presente trabajo debido a las diferencias en relación a la metodología, el sustrato y los volúmenes de NaClO empleados. No obstante, ambos estudios al igual que el nuestro mostraron una reducción en el cloro libre disponible de las soluciones al estar en contacto con los diferentes sustratos.

En relación a la actividad antimicrobiana, las soluciones de NaClO y NaClO/HEBP mostraron una efectiva actividad frente a las biopelículas de *E. faecalis* en ausencia de dentina después de 3 minutos. El tiempo de evaluación de la actividad antimicrobiana fue de 3 minutos porque es un tiempo comúnmente utilizado para la erradicación de biopelículas de *E. faecalis* con soluciones de NaClO^{297,298,299} y porque las soluciones fueron altamente efectivas en este tiempo. Además,

²⁹⁵ Camps J, Pommel L, Aubut V, Verhille B, Satoshi F, Lascola B, About I. 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:e66-73.

²⁹⁶ Macedo RG, Wesselink PR, Zaccheo F, Fanali D, Van Der Sluis LW. Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. *Int Endod J* 2010;43:1108-15.

²⁹⁷ 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.

²⁹⁸ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, Monteiro Bramante C, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 2015;48:1188-93.

²⁹⁹ 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.

los niveles de cloro y pH se estabilizaron después de 1-3 minutos, lo que disminuye la posibilidad de que las soluciones continúen ejerciendo su acción pasado este tiempo³⁰⁰.

A pesar de la reducción significativa que se observó en la actividad de las soluciones de NaClO al 1%/HEBP al 9% y de NaClO al 2,5% en presencia de dentina, estas soluciones no perdieron el efecto antimicrobiano en comparación con el grupo control. En el caso de NaOCl al 2,5%, la concentración de cloro libre después de estar en contacto con la dentina durante 3 minutos fue superior al 0,5%, la cual es una concentración que puede considerarse antimicrobiana³⁰¹. No obstante el efecto de esta solución fue significativamente menor en comparación con la solución no mezclada con dentina.

Con respecto a la concentración de NaClO al 1%, Haapasalo *et al.* (2000)³⁰² mostraron una disminución del efecto antimicrobiano en presencia de dentina, aunque éste no se eliminó totalmente. Cuando expusieron NaClO a un cultivo planctónico de *E. faecalis*, fue capaz de matar todas las bacterias, mientras que la solución en presencia de dentina retrasó en gran medida el efecto antimicrobiano. En este estudio se observó una reducción progresiva de 0,28 y 0,40% del cloro libre de las soluciones de NaClO al 1% con y sin HEBP después de 3 minutos de contacto con la dentina. A pesar de esa reducción, la solución de NaClO al 1% combinada con HEBP mostró una actividad antimicrobiana significativa a diferencia de la solución sin el quelante (que perdió completamente su actividad). Este fenómeno podría explicarse por dos motivos: 1. la interacción química de la dentina infectada con el HEBP³⁰³, que probablemente permitiría el desprendimiento de bacterias de la superficie de la dentina, incluso cuando hay una baja concentración de cloro en la solución; 2. por el efecto del HEBP en la estructura del *biofilm*. De hecho, en este estudio se vió que el HEBP reduce significativamente por sí mismo el biovolumen total de *biofilm* en comparación con el control.

En relación a la solución de NaClO al 2,5%/HEBP, la presencia de HEBP fue beneficiosa en contacto con el polvo de dentina debido a que evitó la inactivación del NaClO por parte del mismo, a pesar de la reducción importante que sufrió el cloro libre tras 3 minutos.

³⁰⁰ 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.

³⁰¹ 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.

³⁰² Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000;33:126-31.

³⁰³ Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J* 2009;42:335-43.

En la interpretación de los resultados es importante tener en cuenta la metodología *in vitro* usada en este estudio. De esta forma, una mayor inactivación de las soluciones irrigadoras es esperada en el interior del conducto radicular en el que estarán presentes diferentes cantidades de detritus y barrillo dentinario así como tejido orgánico y una anatomía compleja, lo que muy probablemente influya en la actividad biológica de las soluciones^{304,305,306,307}. Por ello, son necesarios más estudios que simulen las condiciones clínicas para evaluar la inactivación de soluciones irrigadoras.

En resumen, la presencia de detritus de dentina disminuyó significativamente la actividad antimicrobiana de las soluciones de NaClO al 1%, NaClO al 2,5% y NaClO al 1%/HEBP al 9%. El efecto antimicrobiano del NaClO al 2,5%/HEBP al 9% no se vio afectado por la presencia de detritus de dentina después de 3 minutos. Esto subraya la importancia de refrescar continuamente las soluciones para compensar la pérdida de eficiencia química^{308,309}, además del uso de nuevas estrategias, como el uso de HEBP para reducir la acumulación de materia inorgánica.

5.3. ESTUDIO EX VIVO DE LA INFLUENCIA DEL BARRILLO DENTINARIO EN LA ACTIVIDAD DE SOLUCIONES DE NaClO SOLAS Y COMBINADAS CON HEBP

En este estudio se evaluó la influencia del barrillo dentinario en la actividad antimicrobiana de las soluciones de NaClO en el interior de los túbulos dentinarios, así como la capacidad de dichas soluciones para eliminar el barrillo. Se seleccionó una concentración de NaClO al 2,5% porque en combinación con HEBP reduce la acumulación de detritus de dentina³¹⁰ y mantiene la capacidad de disolución de materia orgánica y actividad antimicrobiana de NaClO^{311,312,313}; este

³⁰⁴ Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 2007;33:917-25.

³⁰⁵ 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.

³⁰⁶ Pappen FG, Qian W, Aleksejūniene J, Leonardo Rde T, Leonardo MR, Haapasalo M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. *J Endod* 2010;36:268-71.

³⁰⁷ Tejada S, Baca P, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT. Influence of dentine debris and organic tissue on the properties of sodium hypochlorite solutions. *Int Endod J* 2019;52:114-122.

³⁰⁸ Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982;15:187-96.

³⁰⁹ Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-98.

³¹⁰ Paqué F, Rechenberg DK, Zehnder M. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. *J Endod* 2012;38:692-5.

³¹¹ Tartari T, Guimarães BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA, Bramante CM. Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *Int Endod J* 2015;48: 399-404.

³¹² Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, et al. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. *J Endod* 2014;40:1999-2002.

³¹³ Biel P, Mohn D, Attin T, Zehnder M. Interactions between the Tetrasodium Salts of EDTA and 1-Hydroxyethane 1,1-Diphosphonic Acid with Sodium Hypochlorite Irrigants. *J Endod* 2017;43:657-661.

último incluso en presencia de polvode dentina^{314,315}, como se vio en el Objetivo 1 de este trabajo.

Los resultados de este estudio indican que, en ausencia de barrillo dentinario, NaClO al 2,5% solo y mezclado con HEBP ejerció una acción antimicrobiana importante. Por otro lado, se observó que la presencia de barrillo afectó a la eficacia de la solución de NaClO sola, que se redujo casi el 48%, a diferencia de cuando se combinó con HEBP que no se vio afectada. Esta disminución de la actividad antimicrobiana de las soluciones en presencia de barrillo dentinario coincide con el estudio de Wang *et al.* (2013)³¹⁶, que obtuvo resultados parecidos utilizando una metodología similar y el mismo tiempo de exposición; sin embargo, la concentración de NaClO utilizada en su estudio fue mucho mayor (6%), lo que puede indicar efecto importante que tiene el barrillo dentinario en la solución, con independencia de su concentración.

La disminución de la acción antimicrobiana de NaClO al 2,5% en presencia de barrillo dentinario puede estar relacionada con la incapacidad de la solución para disolver esta capa, lo que podría implicar diversos mecanismos. Por un lado, NaClO reacciona con los componentes orgánicos de la capa barrillo, lo que acelera el consumo del cloro libre disponible, inactivando así la solución^{317,318,319}. Por otro lado, la capa de barrillo dentinario actúa como una barrera que dificulta la difusión de los irrigantes a través de las paredes de dentina infectada y dentro de los túbulos dentinarios³²⁰ (**Figura 4.7.**). Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que mostraron un mayor efecto antimicrobiano cuando NaClO se administró seguido de soluciones quelantes, tales como QMIX (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) o EDTA, frente a las bacterias intratubulares en presencia de barrillo dentinario^{321,322}. La mayor actividad de la combinación NaClO/HEBP en comparación con NaClO solo es, probablemente, debida a la capacidad del

³¹⁴ Arias-Moliz MT, Morago A, Ordinola-Zapata R, et al. Effects of dentin debris on the antimicrobial properties of sodium hypochlorite and etidronic acid. *J Endod* 2016; 42:771–5.

³¹⁵ Tejada S, Baca P, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT. Influence of dentine debris and organic tissue on the properties of sodium hypochlorite solutions. *Int Endod J* 2019;52:114-122.

³¹⁶ Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod* 2013;39:1395–400.

³¹⁷ Arias-Moliz MT, Morago A, Ordinola-Zapata R, et al. Effects of dentin debris on the antimicrobial properties of sodium hypochlorite and etidronic acid. *J Endod* 2016; 42:771–5.

³¹⁸ Macedo RG, Wesselink PR, Zaccheo F, et al. Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. *Int Endod J* 2010;43:1108–15.

³¹⁹ Tejada S, Baca P, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT. Influence of dentine debris and organic tissue on the properties of sodium hypochlorite solutions. *Int Endod J* 2019;52:114-122.

³²⁰ Clark-Holke D, Drake D, Walton R, et al. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. *J Dent* 2003;31:275–81.

³²¹ Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod* 2013;39:1395–400.

³²² Yadav HK, Yadav RK, Chandra A, Tikku AP. A Scanning Electron Microscopic Evaluation of the Effectiveness of Etidronic Acid, SmearClear and MTAD in Removing the Intracanal Smear Layer. *J Dent (Shiraz)* 2017;18:118-126.

HEBP para eliminar el barrillo (95% de los túbulos abiertos)³²³, lo que permite la propagación de NaClO en la estructura de la dentina ejerciendo así su actividad bactericida. También es importante resaltar el efecto añadido de NaClO cuando se mezcla con HEBP; NaClO mantiene sus propiedades biológicas, eliminando microorganismos y disolviendo materia orgánica^{324,325}, mientras que HEBP reduce y elimina la materia inorgánica^{326,327}. En consecuencia, la solución de NaClO al 2,5%/HEBP al 9% podría usarse en cualquier situación, independientemente de la cantidad de barrillo dentinario presente en las paredes del conducto radicular. De esta forma, si hay barrillo, éste sería eliminado por la solución combinada NaClO/HEBP, permitiendo que el NaClO ejerciera su efecto y, en ausencia de barrillo dentinario el HEBP no interferiría en la acción de NaOCI.

Estos resultados confirman la importancia de eliminar la capa de barrillo dentinario para optimizar el efecto de los irrigantes antimicrobianos. Su remoción también mejora la penetración de medicamentos y selladores en los túbulos dentinarios, permitiendo así que los materiales ejerzan su actividad antimicrobiana además de obtener un sellado más hermético³²⁸, este último en el caso de los selladores.

Un aspecto beneficioso de la irrigación continua con la solución de NaClO al 2,5%/HEBP al 9% en lugar de NaClO durante la instrumentación seguida de un agente quelante fuerte, es que se genera una menor cantidad de barrillo dentinario y detritus de dentina^{329,330,331}. Esto ayuda a reducir la reactividad de NaClO con el residuo, lo que significa un menor consumo del cloro libre disponible y, en consecuencia, una mayor estabilidad y efecto de la solución combinada. No obstante, se necesitan más estudios que prueben el efecto antimicrobiano de la solución

³²³ Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J* 2009;42:335–43.

³²⁴ 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.

³²⁵ Tartari T, Guimarães BM, Amoras LS, et al. Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *Int Endod J* 2015;48: 399–404.

³²⁶ Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J* 2009;42:335–43.

³²⁷ Paqué F, Rechenberg DK, Zehnder M. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. *J Endod* 2012;38:692–5.

³²⁸ White RR, Goldman M, Lin PS. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. *J Endod* 1984;10:558–62.

³²⁹ Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J* 2009;42:335–43

³³⁰ Paqué F, Rechenberg DK, Zehnder M. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. *J Endod* 2012;38:692–5.

³³¹ De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J Jr, Paciornik S. Longitudinal cosine optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. *J Endod* 2008;34:71–5.

combinada de NaClO/HEBP en condiciones más cercanas a la situación clínica para confirmar estos hallazgos preliminares.

5.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ELIMINACIÓN DE BARRILLO DENTINARIO DE DISTINTOS PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN DURANTE LA PREPARACIÓN QUÍMICO-MECÁNICA

En este estudio se evaluó la acción antimicrobiana de distintos protocolos de irrigación durante la preparación químico-mecánica frente a bacterias presentes en el interior de los túbulos dentinarios. También se evaluó la eliminación de la capa de barrillo dentinario para determinar su influencia en la desinfección intratubular.

Para la infección de los túbulos dentinarios se siguió el mismo protocolo del apartado anterior^{332,333}, con algunas modificaciones. De esta forma, aunque la evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó en los 4 mm coronales de las raíces, se mantuvo el resto de la raíz con el objetivo de tener todo el conducto radicular durante la preparación químico-mecánica y simular así la situación clínica.

Los protocolos de irrigación incluidos fueron NaClO, NaClO/HEBP y el protocolo de irrigación convencional³³⁴, NaClO seguido de EDTA. Además se incluyó un grupo irrigado con agua para evaluar la acción de la instrumentación dentro de los túbulos dentinarios infectados. Es sabido que el desbridamiento mecánico sin un irrigante antimicrobiano reduce la carga bacteriana en el conducto radicular principal, pero no es posible la erradicación completa^{335,336,337}. En este estudio, cuando se usó agua como irrigante, se obtuvo una reducción significativa del biovolumen intratubular similar a los grupos que incluyeron NaClO. De acuerdo a estos resultados, la reducción del biovolumen intratubular dependería más de la acción de los instrumentos que de los irrigantes. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de las bacterias

³³² 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.

³³³ 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.

³³⁴ Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J* 2010;43:2-15.

³³⁵ 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;28:181-184.

³³⁶ Aydın C, Tunca YM, Senses Z, Baysallar M, Kayaoglu G, Ørstavik D. Bacterial reduction by extensive versus conservative root canal instrumentation in vitro. *Acta Odontol Scand* 2007;65:167-170.

³³⁷ Ferrer-Luque CM, Bejarano I, Ruiz-Linares M, Baca P. Reduction in *Enterococcus faecalis* counts - a comparison between rotary and reciprocating systems. *Int Endod J* 2014;47:380-386.

residuales estaban vivas en el grupo irrigado con agua (69%) soporta el uso de soluciones irrigadoras antimicrobianas durante la preparación químico-mecánica³³⁸.

Todos los protocolos de irrigación que incluyeron NaClO mostraron un comportamiento similar frente a las bacterias del interior de los túbulos dentinarios. De esta forma, todos ellos ejercieron actividad antimicrobiana^{339,340,341} y redujeron el biovolumen de las bacterias, siendo esta actividad no dependiente de la eliminación de la capa de barrillo. Por el contrario, estudios previos (como el realizado en el Objetivo 2 de este trabajo) han demostrado que la actividad antimicrobiana de NaClO dentro de los túbulos disminuye con la presencia de la capa de barrillo^{342,343}, aunque la metodología empleada en éstos es diferente: la dentina se trató con sólo unos pocos microlitros de la solución irrigadora, y no se incluyó la acción mecánica de los instrumentos. La ausencia de influencia del barrillo dentinario en la acción de las soluciones obtenida en nuestro estudio se puede explicar por diversas razones. Por un lado, la penetración del irrigante en la dentina posiblemente dependa más del tamaño molecular del agente químico³⁴⁴ que de la presencia de la capa de barrillo. Por otro lado, NaClO disuelve los componentes orgánicos del barrillo, dejando una capa menos compacta que podría permitir la difusión del irrigante³⁴⁵ y por tanto ejercer su acción antimicrobiana (**Figura 4.9.**). Sin embargo, a pesar de los resultados óptimos obtenidos con NaClO solo en este estudio, hoy en día existe un claro consenso sobre la eliminación de la capa de barrillo, ya que actúa como un depósito bacteriano y también afecta el sellado de los materiales de obturación³⁴⁶.

Por otro lado, es importante resaltar que el comportamiento de las soluciones irrigadoras es diferente sobre las paredes del conducto radicular, donde las biopelículas fueron total o casi completamente eliminadas cuando se utilizó NaClO en combinación con un agente

³³⁸ 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;28:181-184.

³³⁹ Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Baca P, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT. Influence of smear layer on the antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigating solution in infected dentin. *J Endod* 2016;42:1647-1650.

³⁴⁰ Wong DT, Cheung GS. Extension of bactericidal effect of sodium hypochlorite into dentinal tubules. *J Endod* 2014;40:825-829.

³⁴¹ Neelakantan P, Cheng CQ, Mohanraj R, Sriraman P, Subbarao C, Sharma S. Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er:YAG laser in vitro. *Int Endod J* 2015;48:602-610.

³⁴² Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod* 2013;39:1395-1400.

³⁴³ Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Baca P, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT. Influence of smear layer on the antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigating solution in infected dentin. *J Endod* 2016;42:1647-1650.

³⁴⁴ Paqué F, Luder HU, Sener B, Zehnder M. Tubular sclerosis rather than the smear layer impedes dye penetration into the dentine of endodontically instrumented root canals. *Int Endod J* 2006;39:18-25.

³⁴⁵ Aktener BO, Cengiz T, Pişkin B. The penetration of smear material into dentinal tubules during instrumentation with surface-active reagents: a scanning electron microscopic study. *J Endod* 1989;15:588-590.

³⁴⁶ Clark-Holke D, Drake D, Walton R, Rivera E, Guthmiller JM. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. *J Dent* 2003;31:275-281.

quelante^{347,348}. Hay que tener presente que la mayoría de los estudios se centran en la viabilidad bacteriana de las biopelículas superficiales^{349,350} y muy pocos consideran las áreas de difícil acceso como los túbulos dentinarios^{351,352}. Los resultados presentados aquí muestran que los protocolos de irrigación NaClO, NaClO/HEBP y NaClO + EDTA ejercen una actividad antimicrobiana significativamente mayor que la irrigación con agua en los túbulos dentinarios infectados del tercio coronal de las raíces, lo que concuerda con estudios previos^{353,354,355,356}. Aún así, ninguno de los protocolos dejó a los túbulos dentinarios libres de bacterias, siendo su presencia un riesgo de futura reinfección. Hasta cierto punto, se puede esperar que la actividad antimicrobiana de estos protocolos de irrigación varíe a lo largo del conducto radicular, debido a un mayor consumo de cloro y una mayor dificultad para alcanzar el tercio apical. Por lo tanto, se deben realizar futuras investigaciones para explorar tales factores condicionantes.

³⁴⁷ Ferrer-Luque CM, Bejarano I, Ruiz-Linares M, Baca P. Reduction in *Enterococcus faecalis* counts - a comparison between rotary and reciprocating systems. *Int Endod J*2014;47:380-386.

³⁴⁸ Neelakantan P, Cheng CQ, Mohanraj R, Sriraman P, Subbarao C, Sharma S. Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er:YAG laser in vitro. *Int Endod J*2015;48:602-610.

³⁴⁹ 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;47:1058-1063.

³⁵⁰ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, Monteiro Bramante C, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J*2015;48:1188-1193.

³⁵¹ Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod*2013;39:1395-1400.

³⁵² Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Baca P, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT. Influence of smear layer on the antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigating solution in infected dentin. *J Endod* 2016;42:1647-1650.

³⁵³ Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9

³⁵⁴ Kayaoglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gençay Ö, Sorkun K, Salih B. Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod* 2011;37:376-81.

³⁵⁵ Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod* 2013;39:1395-400.

³⁵⁶ Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Baca P, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT. Influence of smear layer on the antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigating solution in infected dentin. *J Endod* 2016;42:1647-1650.

CONCLUSIONES

PRIMERA: La presencia de detritus de dentina favorece la pérdida de cloro libre de las soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP en el tiempo.

SEGUNDA: Los detritus de dentina disminuyen el pH de las soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP en el tiempo.

TERCERA: Todas las soluciones de NaClO en ausencia o presencia de dentina erradicaron las biopelículas de *E. faecalis* en el estudio *in vitro* tras 3 minutos de exposición.

CUARTA: En el estudio *ex vivo*, la presencia de dentina redujo la actividad antimicrobiana y la capacidad de disolución de las biopelículas de las soluciones de NaClO solas y combinadas con HEBP, excepto en el caso de NaClO al 2,5%/HEBP al 9%. La solución de NaClO al 1% perdió completamente su actividad antimicrobiana tras 3 minutos en presencia de los detritus de dentina.

QUINTA: El barrillo dentinario redujo la actividad antimicrobiana de NaClO al 2,5% en el interior de los túbulos dentinarios, pero no afectó a la actividad de la solución cuando se combinó con HEBP.

SEXTA: La solución de NaClO al 2,5% combinada con HEBP al 9% eliminó el barrillo dentinario tras 3 minutos.

SÉPTIMA: Los protocolos de irrigación que incluyeron NaClO, NaClO/HEBP y NaClO + EDTA, mostraron mayor actividad antimicrobiana intratubular que la irrigación con agua durante la preparación químico-mecánica. Además, sólo los grupos de NaClO asociados a HEBP o EDTA fueron capaces de eliminar el barrillo dentinario, siendo más efectiva la combinación con HEBP.

CONCLUSIONS

FIRST: The presence of dentin debris favors the loss of free chlorine from NaOCl solutions alone and combined with HEBP over time.

SECOND: Dentin debris decrease the pH of NaOCl solutions alone and combined with HEBP over time.

THIRD: All NaOCl solutions in the absence or presence of dentin eradicated biofilms of *E. faecalis* in the *in vitro* study after 3 minutes of exposure.

FOURTH: In the *ex vivo* study, the presence of dentine reduced the antimicrobial activity and the dissolution capacity of the NaOCl solutions alone and combined with HEBP, except in the case of 2.5% NaOCl/9% HEBP. The 1% NaOCl solution completely lost its antimicrobial activity after 3 minutes in the presence of dentin debris.

FIFTH: The smear layer reduced the antimicrobial activity of 2.5% NaOCl inside the dentinal tubules, but did not affect the activity of the solution when combined with HEBP.

SIXTH: The 2.5% NaOCl solution combined with 9% HEBP removed the smear after 3 minutes.

SEVENTH: Irrigation protocols that included NaOCl (NaOCl, NaOCl/HEBP and NaOCl + EDTA) showed higher intratubular antimicrobial activity than irrigation with water and the control group (not instrumented or irrigated) during chemical-mechanical preparation. In addition, only the NaOCl groups associated with HEBP or EDTA were able to eliminate the smear layer. The combination with HEBP was more effective.

ANEXOS

1. PUBLICACIONES DE ESTA TESIS DOCTORAL

Los resultados de los trabajos de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas científicas:

Journal of Endodontics

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.

Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Baca P, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT. Influence of Smear Layer on the Antimicrobial Activity of a Sodium Hypochlorite/Etidronic Acid Irrigating Solution in Infected Dentin. J Endod 2016;42:1647-1650.

Microscopy Research and Technique

Morago A, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Baca P, Rodríguez Archilla A, Arias-Moliz MT. Dentine tubule disinfection by different irrigation protocols. Microsc Res Tech 2019;1-6.

2. INDICIOS DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES / *JOURNAL CITATION REPORT (JCR)*

Para la determinación de los indicios de calidad que se exponen a continuación, se ha realizado una búsqueda de la revista y año de publicación en el *Journal of Citation Reports*. Para las citas recibidas se ha utilizado la base de datos *Scopus*.

1. 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.

- ISSN: 0099-2399
- ISO: J Endod.
- Abreviación JCR / *JCR Abbrev*: J ENDODONT
- Categorías / *Categories*: Dentistry, oral surgery & medicine
- Índice de impacto / *Journal impact factor*: 2,807
- Índice de impacto de 5 años / *5 years impact factor*: 3,182
- Orden / *Rank*: 15/90
- Cuartil / *Quartile*: Q1
- Citas recibidas / *Citations*: 8 (a 2 de abril de 2019)

2. **Morago A**, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Baca P, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT. Influence of Smear Layer on the Antimicrobial Activity of a Sodium Hypochlorite/Etidronic Acid Irrigating Solution in Infected Dentin. *J Endod* 2016;42:1647-1650.

- ISSN: 0099-2399
- ISO: J Endod.
- Abreviación JCR / *JCR Abbrev*: J ENDODONT
- Categorías / *Categories*: Dentistry, oral surgery & medicine-scie
- Índice de impacto / *Journal impact factor*: 2,807
- Índice de impacto de 5 años / *5 years impact factor*: 3,182
- Orden / *Rank*: 15/90
- Cuartil / *Quartile*: Q1
- Citas recibidas / *Citations*: 7 (a 2 de abril de 2019)

3. **Morago A**, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Baca P, Rodríguez Archilla A, Arias-Moliz MT. Dentine tubule disinfection by different irrigation protocols. *Microsc Res Tech.* 2019;1-6.

- ISSN: 1059-910X

- ISO: Microsc. Res. Tech.

- Abreviación JCR / *JCR Abbrev*: MICROSC RES TECHNIQ

- Categorías / *Categories*: Anatomy & Morphology, Biology, Microscopy

- Índice de impacto / *Journal impact factor*: 1,087

- Índice de impacto de 5 años / *5 years impact factor*: 1,134

- Orden / *Rank*: 15/21

- Cuartil / *Quartile*: Q3

- Citas recibidas / *Citations*: 0 (a 2 de abril de 2019)

