



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

**Eficacia antibacteriana y
biocompatibilidad de
soluciones irrigadoras en
Endodoncia**

Autora:

Carmen María Solana Ferrer

Directoras:

Pilar Baca García

María Teresa Cabrera Castillo

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

Escuela Internacional de Posgrado

Granada, 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Carmen María Solana Ferrer
ISBN: 978-84-1306-610-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63623>

A mi madre, mi ejemplo y mi suerte

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

Gracias de todo corazón a mis directoras.

A la Dra. Pilar Baca por su gran generosidad, constante apoyo y oportunos consejos. Sin su confianza y dedicación no habría sido posible llegar hasta aquí.

A la Dra. Teresa Cabrera por su cariño, paciencia infinita y ayuda incondicional. Su pasión por la docencia y su disciplina son un modelo a seguir.

Al Dr. Mariano Valderrama Bonnet por su contribución en el análisis estadístico de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Matilde Ruíz Linares por su implicación, colaboración y más importante aún, por su tiempo y afecto.

Al Dr. Alberto Rodríguez Archilla por sus constantes ánimos, entusiasmo y ayuda desinteresada siempre que lo he necesitado.

A Francisca Castillo Pérez y a Yudi Gómez Villaescusa por sus enseñanzas, dedicación y aprecio.

Por último, gracias a mi familia.

A mi padre, por su ejemplo de fortaleza y pasión por vivir. Por apoyarme y enseñarme que todo se puede conseguir con esfuerzo.

A mi madre, por animarme siempre, comprenderme como nadie y esforzarse para que siempre de lo mejor de mi misma.

A mi abuela Carmen, que tengo la suerte de tener hoy aquí conmigo, por su cariño. Y a mis abuelos, Francisco, Carmen y Eduardo, que les habría encantado.

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract	1
2. Introducción	7
2.1. Infección endodóntica	9
2.1.1. Microbiología de la infección endodóntica	10
2.1.2. <i>Enterococcus Faecalis</i> en la infección endodóntica ..	11
2.1.3. Factores de virulencia de <i>E. Faecalis</i>	13
2.2. Soluciones irrigadoras	17
2.2.1. Agentes antimicrobianos	18
2.2.2. Agentes quelantes	23
2.2.3. Agentes surfactantes	26
2.3. Desinfección de conductos radiculares	30
2.3.1. Protocolos de desinfección	31
2.3.2. Soluciones combinadas	33
2.4. Biocompatibilidad de soluciones irrigadoras	37
3. Justificación	41
4. Objetivos e Hipótesis	47

5. Material y Métodos	51
5.1. Eficacia antimicrobiana de soluciones irrigadoras	53
5.1.1. Selección y preparación de la muestra	53
5.1.2. Preparación de las unidades volumétricas de dentina	53
5.1.3. Preparación de las soluciones y grupos de estudio	55
5.1.4. Infección de la dentina	57
5.1.5. Test de actividad antimicrobiana frente a biopelículas de <i>E. Faecalis</i>	58
5.1.6. Microscopía láser confocal	61
5.1.7. Variables estudiadas y análisis estadístico	62
5.2. Biocompatibilidad de soluciones irrigadoras	63
5.2.1. Citotoxicidad de soluciones irrigadoras	63
5.2.2. Variables estudiadas y análisis estadístico	68
6. Resultados	69
6.1. Eficacia antimicrobiana de soluciones irrigadoras	71
6.2. Biocompatibilidad de soluciones irrigadoras	74
7. Discusión	79
8. Conclusiones	95
9. Bibliografía	99
10. Anexos	125

Resumen/Abstract

La preparación del conducto radicular se relaciona con el concepto clínico de limpieza y desinfección mediante la instrumentación e irrigación con sustancias químicamente activas. La solución irrigadora por excelencia es el hipoclorito de sodio (NaClO), por su capacidad para disolver el tejido vital y necrótico y reducir o minimizar la microbiota presente en el sistema de conductos radiculares. El uso de agentes quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), es necesario por su capacidad para eliminar el barrillo dentinario y prevenir la acumulación de detritus. Recientemente, con objeto de reducir el tiempo de trabajo durante la preparación del conducto radicular, se ha propuesto el uso combinado de agentes quelantes alcalinos con NaClO como única solución de irrigación. El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar la actividad antimicrobiana y la citotoxicidad de soluciones de NaClO y EDTA tetrasódico alcalino (EDTANa₄), solas y combinadas, con o sin la adición de cetrimida (CTR) en su composición.

Las soluciones antimicrobianas se evaluaron frente a biopelículas de *E. faecalis* cultivadas durante tres semanas en especímenes de dentina radicular. Los grupos de estudio fueron (n=10/grupo): 1, NaClO 2,5%; 2, EDTANa₄ 10%; 3, EDTANa₄ 20%; 4, NaClO 2,5% + EDTANa₄ 5%; 5, NaClO 2,5% + EDTANa₄ 10%; 6, NaClO 2,5% + EDTANa₄ 5% + CTR 0,2%, 7, NaClO 2,5% + EDTANa₄ 10% + CTR 0,2%, y 8, control de solución salina (SS) al 0.9%. La viabilidad bacteriana fue evaluada con el método de trifosfato de adenosina (ATP) y la luminiscencia producida se expresó en unidades de luz relativa (ULRs). Se utilizaron técnicas de cultivo para determinar los recuentos de unidades formadoras de colonias (UFCs). La evaluación de

Resumen

la citotoxicidad de las soluciones se realizó sobre una línea celular de fibroblastos humanos de pulmón (HPF), en tiempos de 1 y 24 horas. Para determinar la viabilidad/metabolismo de las células en contacto con las soluciones, se utilizó el ensayo metil tiazol tetrazolio (MTT).

Hubo una correlación positiva entre ULRs y $\log_{10} (\text{UFCs} + 1)/\text{ml}$. En los grupos en los que estaba presente el NaClO no hubo crecimiento bacteriano (UFCs). La menor eficacia antimicrobiana la mostraron los grupos EDTANa₄. Hubo una reducción de ULRs similar en todos los grupos de estudio que contenían NaClO. En relación a la citotoxicidad, para ambos tiempos, la solución de NaClO al 2,5% obtuvo la viabilidad celular más baja. La asociación de NaClO con EDTANa₄ aumentó la viabilidad celular en relación directa a la concentración del agente quelante. Globalmente, después de 24 horas, la viabilidad celular se redujo en todos los grupos de estudio.

Root canal preparation is related to the clinical concept of cleaning and disinfection by means of instrumentation and irrigation with chemically active substances. The irrigation solution par excellence is sodium hypochlorite (NaOCl), because of its ability to dissolve vital and necrotic tissue and reduce or minimize biofilms present in the root canal system. The use of chelating agents, such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), is necessary because of its ability to remove the smear layer and prevent the accumulation of debris. Recently, in order to reduce the time of treatment during root canal preparation, the combined use of alkaline chelating agents with NaOCl has been proposed as only irrigation solution. The aim of this study was to evaluate and compare the antimicrobial activity and cytotoxicity of NaOCl and alkaline tetrasodium EDTA (EDTANa₄) solutions, alone and combined, with or without the addition of cetrимide (CTR) in their composition.

The antimicrobial solutions were evaluated on a 3-week biofilm of *E. faecalis* grown on radicular dentin specimens. The study groups were (n=10/group): 1, NaOCl 2.5%; 2, EDTANa₄ 10%; 3, EDTANa₄ 20%; 4, NaOCl 2.5% + EDTANa₄ 5%; 5, NaOCl 2.5% + EDTANa₄ 10%; 6, NaOCl 2.5% + EDTANa₄ 5% + CTR 0.2%, 7, NaOCl 2.5% + EDTANa₄ 10% + CTR 0.2%, and 8, 0.9% saline control. Bacterial viability was determined by adenosine triphosphate assay (ATP) and the luminescence produced was expressed in relative light units (RLUs). Culture techniques were used to determine colony-forming units (CFUs) counts. The solutions cytotoxicity evaluation was performed on a human pulmonary fibroblast cell line (HPF), after 1 and 24 hours.

Abstract

Methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay was used to determine the viability of cells in contact with the solutions.

There was correlation between RLUs and $\log_{10} (\text{CFUs} + 1)/\text{ml}$. In the NaOCl groups there was no bacterial growth (CFUs). The lowest antimicrobial efficacy was found for the EDTANa₄ groups. A similar reduction of RLUs in all NaOCl groups was seen. Regarding to cytotoxicity, the lowest viability was obtained with a 2.5% NaOCl solution at both time periods. The association of NaOCl with EDTANa₄ increased the cellular viability in direct relation with the concentration of the chelating agent. Globally, after 24 hours of exposure, cell viability reduced in all study groups.

Introducción

2.1. INFECCIÓN ENDODÓNTICA

La infección endodóntica está causada por una comunidad microbiana mixta organizada en forma de biopelículas. Una biopelícula es una estructura formada por células bacterianas encerradas en una matriz polimérica extracelular autoproducida unida sobre una superficie¹. Las biopelículas también se pueden considerar como una capa de condensación de microbiota, unida irreversiblemente a un sustrato o interfaz o entre sí, que se incrusta en una matriz de polisacáridos extracelulares compuesta, además, por proteínas, lípidos y ADN extracelular².

La infección endodóntica puede ser primaria o secundaria. La infección primaria implica la inflamación de la pulpa radicular después de la invasión de microorganismos o subproductos microbianos, considerándose una infección adquirida o emergente.

La infección secundaria es la infección posterior al tratamiento y puede ocurrir como infección remanente o persistente, o como infección recurrente. La infección persistente se produce en casos donde la lesión original de periodontitis apical no se ha curado después del tratamiento endodóntico primario, existiendo microbiota residual de la infección original. Por otra parte, la infección recurrente se genera en dientes cuya lesión original se ha curado, pero posteriormente el conducto radicular ha sido nuevamente invadido después del tratamiento³.

¹ Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006;39:249-81.

² Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14:563-75.

³ Haapasalo M, Udnæs T, Endal, U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Top.* 2003;6:29-56.

2.1.1. Microbiología de la infección endodóntica

La microbiota bacteriana del conducto radicular está inicialmente formada por aerobios y anaerobios facultativos⁴. A medida que la enfermedad progresa, la ecología dentro del sistema del conducto radicular cambia.

Las infecciones endodónticas primarias son polimicrobianas y en ellas predominan *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Peptostreptococcus* y especies de *Camphylobacter*. En las infecciones secundarias la flora microbiana presente es capaz, por lo general, de sobrevivir en condiciones adversas, como un amplio rango de pH y escasez de nutrientes. Existe un claro contraste entre los fenotipos microbianos presentes en la infección primaria en comparación con la infección secundaria, predominando en esta última las bacterias gram-positivas⁵.

Diferentes estudios han demostrado la prevalencia de ciertas especies en dientes con infección posterior al tratamiento, como *Enterococci*, *Streptococci*, *Lactobacilli* y *Actinomyces*. En particular, se observó una alta proporción de *E. faecalis* en casos con periodontitis apical persistente^{6,7}. En este sentido, la persistencia de microorganismos

⁴ Antunes H.S, Rocas I.N, Alves F.R, Siqueira J.F Jr. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. J Endod. 2015;41:1037-1042.

⁵ Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, Wittmer A, Schmid M, Karygianni L et al. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. PLoS One. 2012;7:e49576.

⁶ Love RM. Enterococcus faecalis - a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001;34:399-405.

⁷ Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu C, Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. J Endod. 2012;38:954-9.

dentro del sistema de conductos radiculares después del tratamiento está considerada la principal causa de fracaso⁸.

2.1.2. *E. faecalis* en la infección endodóntica

La presencia de periodontitis apical persistente o emergente, después del tratamiento de conductos radiculares, es el resultado de la infección endodóntica no controlada. *E. faecalis* es una especie comúnmente aislada en la periodontitis apical persistente^{9,10} y puede tolerar condiciones extremas¹¹, incluso es capaz de soportar períodos prolongados en ambientes nutricionalmente limitados¹². Su supervivencia a largo plazo en el sistema de conductos radiculares puede ser el resultado de su habilidad para adherirse a la dentina, mediante la sustancia de agregación y otras adhesinas de superficie, e invadir los túbulos dentinarios^{13,14}. La capacidad para penetrar en los túbulos dentinarios le sirve de protección frente a los medicamentos endodónticos¹⁵. Además, la formación de comunidades organizadas en

⁸ Alves FR, Andrade-Junior CV, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Rôças IN, Versiani MA et al. Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro-Computed Tomography, and Cryopulverization Approach. J Endod. 2016;42:1667-1672.

⁹ 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.

¹⁰ Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. J Endod. 2014;40:670-677.

¹¹ Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of Enterococcus faecalis in root canals ex vivo. Int Endod J. 2005;38:735-42.

¹² Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of enterococcus faecalis in human serum. Oral Microbiol Immunol. 2003;18:234-239.

¹³ Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod. 2002;28:689-93.

¹⁴ Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32:389-98.

¹⁵ Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of enterococcus faecalis: Relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15:308-320.

forma de biopelículas contribuye a la resistencia bacteriana y a su persistencia después de los procedimientos antimicrobianos¹⁶ (Figura 1).

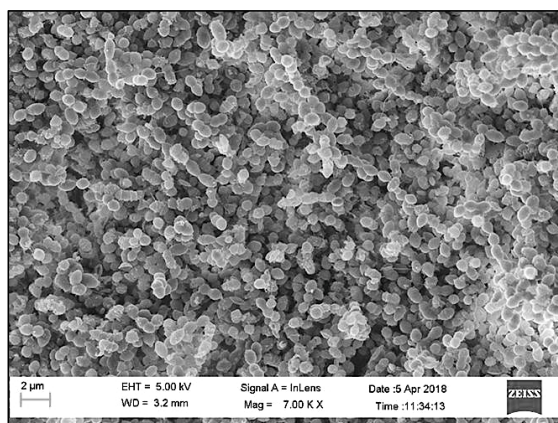


Figura 1. Biopelícula de *E. faecalis*.

En cuanto a las infecciones endodónticas primarias, *E. faecalis* se asocia más a las lesiones perirradiculares crónicas asintomáticas que a la periodontitis perirradicular aguda o al absceso perirradicular agudo¹⁷. Su presencia en dientes con tratamiento endodóntico y lesión perirradicular es más frecuente que en infecciones endodónticas primarias y puede deberse a que los enterococos sean colonizadores primarios del sistema de conductos radiculares y sobrevivan al tratamiento, o a que invadan de manera oportunista el conducto radicular necrótico o incorrectamente relleno o sellado y, por lo tanto, entren durante o después del tratamiento.

¹⁶ Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod.* 2008;34:850-4.

¹⁷ Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal Endod.* 2004;30:315-320.

En los casos de periodontitis persistente, *E. faecalis* es con frecuencia el patógeno dominante, lo cual sugiere que esta especie puede potencialmente mantener la infección y la lesión perirradicular. Por tanto, su eliminación durante el tratamiento de conductos radiculares es importante¹⁸.

2.1.3. Factores de virulencia de *E. faecalis*

Los factores de virulencia de *E. faecalis* incluyen: adhesinas (sustancia de agregación, proteína de superficie de enterococos o Esp y proteína de adhesión de colágeno o Ace) citolisina, enzimas proteolíticas y degradativas (gelatinasa, hialuronidasa y proteasa serina), ácidos lipoteicoicos, feromonas sexuales y radicales de oxígeno.

- Sustancia de agregación (SA): es una adhesina bacteriana receptiva a las feromonas, que convierte la superficie de la bacteria donadora en una superficie potencialmente adherente para las células receptoras, causando agregación o agrupación y a su vez facilitando el intercambio de plásmidos¹⁹. Además, media la adhesión de la bacteria a células eucariotas y tiene acción sinérgica con las citolisinas, lo que aumenta la virulencia y el daño tisular²⁰.

- Proteínas de superficie: la proteína Esp (*Enterococcal surface protein*) promueve la unión primaria y la formación de biopelículas de

¹⁸ Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FGR, Nascimento GG, Carvalho CAT, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. J Endod. 2015;41:824-830.

¹⁹ Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors on *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15:308-320.

²⁰ Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *enterococcus-faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect Immun. 1992;60:25-30.

Introducción

E. faecalis en superficies abióticas²¹. La proteína Ace (*Enterococcal collagen adhesin*) es una proteína vinculada al colágeno. Es una molécula adherida a la matriz extracelular que media la adherencia al colágeno tipo I y IV, a las proteínas de la matriz y a la laminina²².

- Citolisina: es una toxina que produce la lisis de eritrocitos, neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos, y también puede destruir células bacterianas²³. Su producción por parte de *E. faecalis* contrarrestaría los efectos de la terapia antibiótica y antimicrobiana debido a la actividad organotóxica de esta sustancia²⁴.

- Enzimas proteolíticas (gelatinasa y proteasa serina): La gelatinasa es una metaloproteínasa²⁵ cuya función principal es proporcionar peptonutrientes al organismo bacteriano. Sin embargo, también son capaces de causar daño directo o indirecto en los tejidos del huésped. La gelatinasa puede hidrolizar la gelatina, el colágeno, el fibrinógeno, la caseína, la hemoglobina, la insulina y algunos péptidos relacionados con las feromonas sexuales y otros péptidos bioactivos. La proteasa serina es una endopeptidasa con gran actividad proteolítica, capaz de permanecer estable y activa en un amplio rango de pH. Los péptidos y aminoácidos producidos tanto por la gelatinasa, como por la proteasa

²¹ Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M et al. The enterococcal surface protein, esp, is involved in enterococcus faecalis biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:4538-45.

²² Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun.* 2000;68:5218-5224.

²³ Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. Enterococcus faecalis – the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. *Endodontic Topics.* 2003;6:135-159.

²⁴ Jett B, Jensen H, Nordquist R, Gilmore M. Contribution of the pAD1-Encoded Cytolysin to the Severity of Experimental Enterococcus faecalis Endophthalmitis. *Infect Immun.* 1992;60:2445-52.

²⁵ Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors on Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:308-320.

serina, podrían ser una fuente importante de nutrientes para el crecimiento bacteriano dentro del sistema de conductos radiculares²⁶.

- Hialuronidasa: enzima degradativa capaz de descomponer el ácido hialurónico y despolimerizar los mucopolisacáridos del tejido conectivo, aumentando la invasividad bacteriana²⁷. Además, esta enzima podría abastecer de nutrientes a los microorganismos, debido a que los productos de degradación de los sustratos son los disacáridos, los cuales pueden ser transportados y metabolizados intracelularmente por las bacterias²⁸.

- Ácidos lipoteicoicos: son un grupo de moléculas anfipáticas asociadas a membranas, comunes entre los organismos procariotas²⁹. A través de su fracción lipídica estas moléculas de superficie se unen a una amplia variedad de células, incluyendo plaquetas, eritrocitos, linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y células epiteliales. Son capaces de facilitar la formación de agregados, la transferencia de plásmidos y modular la respuesta inflamatoria mediante la estimulación de leucocitos para que liberen mediadores, que participan en diversas fases de la respuesta inflamatoria³⁰.

²⁶ Hubble T, Hatton J, Nallapareddy S, Murray B, Gillespie M. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:121-126.

²⁷ Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors on *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:308-320.

²⁸ Hynes W, Walton S. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;183:201-207.

²⁹ Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7:462-478.

³⁰ Ehrenfeld E, Kessler R, Clewell D. Identification of Pheromone-Induced Surface Proteins in *Streptococcus faecalis* and Evidence of a Role for Lipoteichoic Acid in Formation of Mating Aggregates. *J Bacteriol.* 1986;168:6-12.

Introducción

- Feromonas sexuales: son pequeños péptidos hidrofóbicos que promueven la transferencia de plásmidos de ADN entre las cepas³¹. La resistencia a los antibióticos y otros rasgos de virulencia, como la producción de citolisina, se pueden transferir entre cepas de *E. faecalis* a través del sistema de feromonas sexuales³².

- Superóxido extracelular: es un radical de oxígeno altamente reactivo comúnmente aislado en cepas de *E. faecalis*. El efecto destructivo del anión de superóxido y otros radicales de oxígeno se genera sobre una amplia variedad de compuestos biológicos tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos³³.

³¹ Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors on Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15:308-320.

³² Clewell DB, Weaver KE. Sex-pheromones and plasmid transfer in enterococcus-faecalis. Plasmid. 1989;21:175-184.

³³ Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors on Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15:308-320.

2.2. SOLUCIONES IRRIGADORAS

Los objetivos de la irrigación en el tratamiento endodóntico son: disolución de restos pulpares vitales o necróticos, limpieza de las paredes del conducto radicular, eliminación bacteriana y neutralización de sus productos, acción lubricante para facilitar la instrumentación y acción blanqueante de la corona dentaria³⁴.

La solución irrigadora ideal debería tener las siguientes propiedades: amplio espectro antimicrobiano, alta eficacia frente a biopelículas de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos, inactivación de endotoxinas³⁵, efecto antibacteriano sostenido³⁶, capacidad para disolver materia orgánica y eliminar o prevenir la formación de barrillo dentinario. Asimismo, deben poseer acción lubricante para reducir la fricción de los instrumentos durante la preparación y facilitar la remoción de dentina. Además, es importante que no sean citotóxicos, ni dañen o irriten los tejidos periapicales³⁷. No obstante, ninguna de las soluciones irrigadoras disponibles cumple todos los requisitos y actualmente el uso de al menos dos soluciones, solas o combinadas, en una secuencia adecuada son utilizadas en el tratamiento de conductos radiculares.

³⁴ 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.

³⁵ Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32:389-98.

³⁶ Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK, Linda L. Clinical implications of the smear layer in endodontics: A review. Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94:658-66.

³⁷ Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. Dent Clin North Am. 2010;54:291-312.

2.2.1. Agentes antimicrobianos

El NaClO y la clorhexidina (CLX) son las soluciones irrigadoras con acción antimicrobiana más usadas en endodoncia. Habitualmente se utiliza como solución irrigadora, durante la preparación biomecánica, el NaClO y la CLX como solución irrigadora final.

Hipoclorito de sodio (NaClO)

Es un compuesto halogenado, altamente oxidante y un agente de amplio espectro antibacteriano, esporicida y viricida. Es una base fuerte, con un pH de 11-12. Se utiliza a concentraciones del 0,5% al 6%³⁸ y su eficacia ha sido confirmada³⁹, siendo la solución más empleada en endodoncia por sus excelentes propiedades antibacterianas y por su capacidad para disolver tejidos orgánicos⁴⁰.

Actúa sobre la viabilidad bacteriana frente a microorganismos en estado planctónico y en forma de biopelícula, promoviendo la disrupción de la matriz extracelular de éstas y su disolución^{41,42}. Su actividad antibacteriana reside en la disponibilidad de cloro libre, en forma de iones hipoclorito (ClO⁻) y ácido hipocloroso (HClO)⁴³.

³⁸ Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: A review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003;36:75-85.

³⁹ Siqueira JF, 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;30:279-282.

⁴⁰ 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;94:756-762.

⁴¹ 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.

⁴² Arias-Molíz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod.* 2009;35:711-4.

⁴³ Baker RW. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins: 1. Physico-chemical study of the course of the reaction. *Biochem J.* 1947;41:337-342.

Los iones hipoclorito prevalecen en soluciones alcalinas ($\text{pH} > 7,6$) y son responsables de la mayor capacidad de disolución de tejidos orgánicos. Sin embargo, el ácido hipocloroso prevalece en soluciones ácidas ($\text{pH} < 7,6$) y tiene un efecto bactericida más fuerte, posiblemente debido a que el menor tamaño de la molécula sin carga permite que penetre en la membrana bacteriana⁴⁴.

El grupo HClO oxida los grupos tiol o sulfhidrilo (SH) y amino (NH) de las proteínas de los microorganismos, provocando la formación de cloraminas dentro del sistema de enzimas bacterianas y alterando así el metabolismo del microorganismo⁴⁵. Esto provoca la degradación y destrucción de fosfolípidos y ácidos grasos, lo que conlleva una inactivación enzimática irreversible en las bacterias, ejerciendo una acción germicida rápida y eficaz⁴⁶.

Además de su amplia actividad antimicrobiana, es un agente económico y fácil de obtener, y es el mayor disolvente de materia orgánica. Dentro del sistema de conductos radiculares ha demostrado ser capaz de disolver el tejido pulpar, tanto vital como necrótico, y las fibras de colágeno⁴⁷. La reacción química responsable de esta función es conocida como saponificación. El NaClO actúa como un disolvente de

⁴⁴ Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:295–298.

⁴⁵ 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.

⁴⁶ Siqueira JF, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics.* 2000;26:331–334.

⁴⁷ Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54:291–312.

materia orgánica degradando triglicéridos y transformándolos en sales de ácido graso libres (jabón) y glicerina (alcohol)⁴⁸.

Su principal desventaja es la incapacidad de eliminar el barrillo dentinario⁴⁹. No obstante, el NaClO es capaz de disolver la parte orgánica del mismo y su completa eliminación se consigue con la subsiguiente aplicación de agentes quelantes⁵⁰. Además, también ejerce una acción destructiva contra las proteínas de la matriz dentinaria, incluyendo el colágeno tipo I y los proteoglicanos, pudiendo alterar las propiedades mecánicas de la dentina⁵¹.

Por otra parte, la disponibilidad de cloro libre en esta solución es limitada, consumiéndose rápidamente cuando la solución entra en contacto con la materia orgánica de los conductos radiculares⁵². Por consiguiente, la renovación regular, la utilización de volúmenes grandes de irrigante y su presencia en el conducto radicular durante períodos de tiempo más largos, son factores que mejoran la eficacia del NaClO⁵³. Además, es conocido que el aumento de la concentración⁵⁴ y

⁴⁸ 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.

⁴⁹ Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Garcia EG, Duarte MAH et al. Antimicrobial activity of chlorhexidine, peracetic acid and sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against enterococcus faecalis biofilms. *Int Endod J.* 2015;48:1188-1193.

⁵⁰ Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54:291-312.

⁵¹ Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppim-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. *J Dent.* 2009;37:903-908.

⁵² Macedo RG, Verhaagen B, Wesselink PR, Versluis M, van der Sluis LW. Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int Endod J.* 2014;47:147-154.

⁵³ Siqueira JF, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics.* 2000;26:331-334.

⁵⁴ 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.

temperatura⁵⁵ mejoran su eficacia antibacteriana y la disolución del tejido, pero también su toxicidad⁵⁶. En este sentido, su inyección accidental más allá del ápice radicular puede causar dolor, inflamación, hemorragia y, en algunos casos, infección secundaria y parestesia⁵⁷. La velocidad de flujo de la solución, el tipo de aguja, la profundidad de inserción y la técnica de agitación tienen un efecto significativo sobre la extrusión⁵⁸.

Por tanto, una concentración ideal sería aquella que posea una adecuada eficacia antibacteriana con una baja toxicidad.

Clorhexidina (CLX)

Es una bisbiguanida catiónica sintética con carga positiva, que interactúa con los fosfolípidos y lipopolisacáridos de la membrana celular de las bacterias⁵⁹. El digluconato de CLX es una sal altamente soluble en agua que se disocia fácilmente y libera el componente cargado positivamente a un pH fisiológico⁶⁰. Su eficacia se basa en la interacción entre la carga positiva de la molécula y la carga negativa de

⁵⁵ Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *Journal of Endodontics*. 2005;31:669-671.

⁵⁶ Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in-vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1973;36:856-871.

⁵⁷ Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endodontic Topics*. 2012;27:74-102.

⁵⁸ Boutsoukis C, Psimma Z, Kastrinakis E. The effect of flow rate and agitation technique on irrigant extrusion ex vivo. *Int Endod J*. 2014;47:487-96.

⁵⁹ Dynes JJ, Lawrence JR, Korber DR, Swerhone GDW, Leppard GG, Hitchcock AP. Speciation and Quantitative mapping of chlorhexidine in natural river biofilms. *Science of the Total Environment*. 2006;369:369-383.

⁶⁰ Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine - an adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol*. 1986;57:370-377.

Introducción

los grupos fosfato de la pared celular bacteriana. Su efecto bacteriostático a bajas concentraciones causa una alteración del equilibrio osmótico de la bacteria y una fuga de potasio y fósforo. A altas concentraciones es bactericida, provocando la precipitación del contenido citoplasmático de la célula bacteriana, dando como resultado la muerte celular^{61,62}.

En endodoncia se utiliza ampliamente como agente de irrigación y como medicación intraconducto por su sustantividad^{63,64}. Dicha propiedad permite su adsorción en sustratos aniónicos (hidroxiapatita, biopelículas, glicoproteínas salivares y membranas mucosas) dando lugar a una liberación gradual a niveles terapéuticos⁶⁵. Previene la colonización bacteriana en la superficie de la dentina durante largos periodos^{66,67} y permanece en la dentina radicular en cantidades antimicrobianas eficaces durante al menos 12 semanas^{68,69}. Además, no

⁶¹ Gomes B, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003;36:267-275.

⁶² Ryan S. Chlorhexidine as a canal irrigant: A review. *Compend Contin Educ Dent.* 2010;31:338-364.

⁶³ Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98:488-92.

⁶⁴ Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazonni A et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater.* 2010;26:779-85.

⁶⁵ Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J.* 2006;32:112-115.

⁶⁶ Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:240-245.

⁶⁷ Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J.* 2007;52:S64-S82.

⁶⁸ Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98:488-92.

⁶⁹ Baca P, Junco P, Arias Molíz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J Endod.* 2012;38:927-30.

interfiere con el colágeno de la matriz dentinaria⁷⁰. No obstante, no es capaz de disolver el tejido orgánico e inorgánico y se inactiva en presencia de materia orgánica⁷¹. Asimismo, exhibe mayor toxicidad frente a componentes celulares humanos que el NaClO a la misma concentración^{72,73}. Por ello, se recomienda su uso como solución irrigadora final en los protocolos de irrigación en endodoncia⁷⁴.

2.2.2. Agentes quelantes

Según la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) la quelación en endodoncia es la remoción de iones inorgánicos de la estructura dentaria mediante un agente químico⁷⁵.

Los agentes quelantes se utilizan para remover la capa de barrillo dentinario o *smear layer*, una película superficial de residuos creados durante la instrumentación (Figura 2)⁷⁶. Contiene componentes orgánicos

⁷⁰ Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J Endod.* 2009;35:1023–1027.

⁷¹ Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009;42:288-302.

⁷² Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2016;49:764–773.

⁷³ Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod.* 2011;37:1109–1115.

⁷⁴ Ferrer-Luque MC, Arias-Molíz TM, Ruíz-Linares M, Martínez García ME, Baca P. Residual activity of cetrinimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* infected root canals. *Int J Oral Sci.* 2014;6:46–9.

⁷⁵ AAE: American Association of Endodontists. Chicago: AAE; [acceso 27 may 2020]. Glossary of Endodontic Terms Disponible en: <http://www.aae.org/clinical-resources/aae-glossary-of-endodontic-terms.aspx>

⁷⁶ Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 2014;216:299-303.

Introducción

e inorgánicos, restos de tejido pulpar vital o necrótico, y puede contener bacterias y sus subproductos e irrigante retenido^{77,78}.

La eliminación de la capa de barrillo dentinario contribuye a una mayor desinfección del sistema de conductos radiculares y a una mejor adaptación de los materiales de obturación⁷⁹. Entre los agentes más utilizados se encuentran el EDTA y el ácido cítrico. Otros agentes como el ácido maleico y ácido ortofosfórico también han sido recomendados^{80,81}

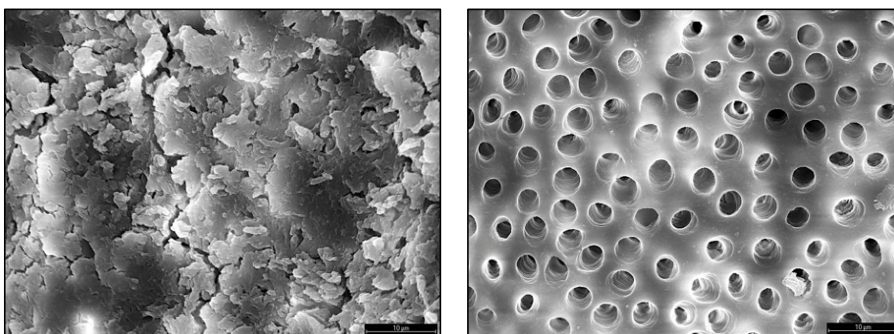


Figura 2. A. Presencia de barrillo dentinario.

Figura 2. B. Ausencia de barrillo dentinario.

⁷⁷ McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod.* 1975;1:238–242.

⁷⁸ AAE: American Association of Endodontists. Chicago: AAE; [acceso 27 may 2020]. Glossary of Endodontic Terms Disponible en: <http://www.aae.org/clinical-resources/aae-glossary-of-endodontic-terms.aspx>

⁷⁹ Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J.* 2010;43:2-15.

⁸⁰ 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;35:1573–1576.

⁸¹ Prado M, Gusman H, Gomes BP, Simão RA. Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. *J Endod.* 2011;37:255–258..

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

Es un agente quelante que fue introducido como solución irrigadora en endodoncia en 1957 por Nygaard-Ostby. Su mecanismo de acción se basa en la capacidad de unión a los iones calcio de la estructura dentaria, formando complejos solubles⁸². Se utiliza para ensanchar los conductos estrechos, atrésicos o calcificados y para eliminar la parte inorgánica del barrillo dentinario tras la preparación del conducto radicular.

Puede utilizarse en forma de sal disódica, trisódica y tetrasódica. Las formas más empleadas son la sal disódica y trisódica de EDTA, que poseen una gran capacidad quelante, por lo que son considerados quelantes fuertes. Generalmente, los quelantes fuertes se utilizan a concentraciones que oscilan entre el 10%⁸³ y el 17%⁸⁴ a pH neutro o ligeramente alcalino (pH 7-8).

Su actividad antibacteriana es limitada sobre bacterias en suspensión⁸⁵ y nula sobre biopelículas de *E. faecalis*⁸⁶. Además, se ha descrito que poseen actividad antifúngica⁸⁷, relacionada con su capacidad de

⁸² Hart JR. Ethylenediaminetetraacetic acid and related chelating agents. En: Hart JR. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol 13. 7a ed. Wiley-VCH: Weinheim; 2012. p. 573–578.

⁸³ Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical-evaluation of the efficacy of edta solution as an endodontic irrigant. Journal of Endodontics. 1995;21:592-593.

⁸⁴ Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. Br Dent J. 2014;216:299-303.

⁸⁵ Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Rodríguez E, Liébana-Ureña J, Espigares-García M. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against Enterococcus faecalis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;106:e84-9.

⁸⁶ 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.

⁸⁷ Ates M, Akdeniz BG, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on Candida albicans. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;100:626-30.

quelación, ya que los iones calcio juegan un papel importante en la morfogénesis y patogénesis de *Candida albicans*.

Por otra parte, su reacción con los iones calcio, presentes en los cristales de hidroxiapatita de la dentina, puede provocar efectos erosivos sobre la dentina dependiendo del tiempo de aplicación⁸⁸. En este sentido, soluciones de EDTA fuertes y de ácido cítrico al 15% descalcifican la dentina radicular en tiempos de 15 minutos, con la mayor parte del calcio extraído durante los primeros 5 minutos de actuación⁸⁹.

La sal tetrasódica del EDTA es un agente quelante débil y su biocompatibilidad permite usarlo en productos cosméticos y de hogar⁹⁰. Además, la combinación con NaClO promueve la disolución del tejido orgánico y la eliminación de la capa de barrillo dentinario durante la preparación del conducto radicular⁹¹.

2.2.3. Agentes surfactantes

Los agentes tensioactivos, llamados también surfactantes o agentes de superficie activa, son sustancias que modifican la relación entre dos superficies, disminuyendo la tensión superficial de la solución a la que

⁸⁸ Calt S, Serper A. Time-dependent effects of edta on dentin structures. J Endod. 2002;28:17-19.

⁸⁹ Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. Int Endod J. 2008;41:418-23.

⁹⁰ O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC. A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. J Endod. 2000;26:739-743.

⁹¹ Tartari T, Oda DF, Zancan RF, Da Silva TL, De Moraes IG, Duarte MAH et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. Int Endod J. 2017;50:106-114.

se añaden⁹². Las propiedades generales y el comportamiento de estos agentes se deben al carácter dual de sus moléculas (grupo hidrófilo y lipófilo). El equilibrio entre estas dos secciones antagónicas de su molécula proporciona al compuesto sus propiedades activas de superficie. Se clasifican en iónicos o no iónicos. A su vez, los iónicos se dividen según la carga que posea la parte que presenta la actividad de superficie en: aniónicos, catiónicos y anfóteros.

Los surfactantes catiónicos se adsorben sobre sustratos cargados negativamente, produciendo una capa hidrófoba que aumenta el ángulo de contacto con el agua, reduciendo de este modo la tensión superficial de los líquidos. Además, y concretamente los surfactantes catiónicos del tipo amonio cuaternario, tienen acción antiséptica y bactericida⁹³. Actúan contra la membrana celular bacteriana, por lo que pueden considerarse antibióticos de amplio espectro⁹⁴. Asimismo, se ha demostrado que no producen descalcificación en la dentina de los conductos radiculares⁹⁵.

La adición de un surfactante a la solución irrigadora podría permitir una mayor penetración de esta en la profundidad de los túbulos

⁹² RAE: Real Academia Española: Diccionario de la lengua española. España: RAE; [Acceso 27 may 2020] Disponible en: <https://dle.rae.es>

⁹³ Merianos JJ. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. En: Block SS. Disinfection, Sterilization, and Preservation. 4a ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 225–62.

⁹⁴ Jennings MC, Minbiole KPC, Wuest WM. Quaternary ammonium compounds: An antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance. *Acs Infect Dis*. 2015;1:288-303.

⁹⁵ Ferrer-Luque CM, Perez-Heredia M, Baca P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP. Decalcifying effects of antimicrobial irrigating solutions on root canal dentin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18:e158-e161.

dentenarios al disminuir su tensión superficial, mejorando su acción antibacteriana⁹⁶.

Cetrimida (CTR)

El bromuro de cetiltrimetilamonio o CTR es un surfactante catiónico derivado del amonio cuaternario que posee una alta actividad bactericida sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas, y ha mostrado también actividad antifúngica⁹⁷. Su carga positiva cambia el signo de la superficie celular microbiana de negativo a positivo produciendo su muerte. Sobre las biopelículas actúa desestabilizando las fuerzas cohesivas que mantienen la integridad de la estructura, desorganizando la matriz polimérica extracelular⁹⁸.

A una concentración del 0,2% ha mostrado capacidad para erradicar biopelículas de *E. faecalis in vitro*^{99,100} y *ex vivo*¹⁰¹, así como sustantividad prolongada en el tiempo¹⁰².

⁹⁶ Giardino L, Ambu E, Bece C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. J Endod. 2006;32:1091-1093.

⁹⁷ Leow N, Abbott P, Castro Salgado J, Firth L. Evaluation of smear layer removal by bicarbonate soda, ethylenediamine tetraacetic acid with cetrimide and sodium hypochlorite with a new model. Aust Endod J. 2012;38:107-12.

⁹⁸ Simoes M, Pereira MO, Vieira MJ. Effects of mechanical stress on biofilms challenged by different chemical. Water Res. 2005;39:5142-52.

⁹⁹ 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.

¹⁰⁰ Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on enterococcus faecalis biofilm in dentin. J Endod. 2011;37:363-366.

¹⁰¹ Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Martínez García ME, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on Enterococcus faecalis-infected root canals. Int J Oral Sci. 2014;6:46-9.

¹⁰² Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. J Endod. 2012;38:927-30.

Una combinación de CLX al 2% + CTR al 0,2% ha sido propuesta, como régimen alternativo de irrigación final, dada su eficaz acción antimicrobiana a largo plazo¹⁰³.

No obstante, generalmente se usa combinado con soluciones antimicrobianas de NaClO (Hypoclean[®]), CLX (Cetrexidin[®]), y agentes quelantes como EDTA (SmearClear[®], EDTAC[®], REDTA[®], QMix[®]), o ácido cítrico (Tetraclean[®]).

¹⁰³ Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. J Endod. 2011;37:1121-3.

2.3. DESINFECCIÓN DE CONDUCTOS RADICULARES

La diferente anatomía y complejidad del sistema de conductos radiculares, además de la composición de la dentina, son desafíos clave para la eficacia de la desinfección en endodoncia¹⁰⁴. La desinfección en dientes necróticos tras un tratamiento de conductos fracasado supone un desafío mayor que en el caso de dientes vitales, tanto desde un punto de vista técnico como microbiológico¹⁰⁵.

La acción mecánica de la instrumentación es eficaz para la reducción bacteriana, incluso cuando no se utilizan irrigantes antibacterianos, y supone un paso muy importante en el proceso de desinfección. En este sentido, se ha mostrado una eficacia antimicrobiana similar con el uso de SS o agua destilada, con técnica de instrumentación manual y sistemas rotatorios, en conductos infectados con *E. faecalis* durante cuatro semanas^{106,107}.

Por otra parte, la eficacia de las soluciones irrigadoras, determinada por sus propiedades químicas, es fundamental para reducir o minimizar la carga bacteriana presente en el sistema de conductos radiculares infectados.

¹⁰⁴ Mohammadi Z, Abbott P. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J. 2009;42:288-302.

¹⁰⁵ Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32:389-98.

¹⁰⁶ Nakamura VC, Cai S, Candeiro GT, Ferrari PH, Caldeira CL, Gavini G. Ex vivo evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. Int Endod J. 2013;46:217-24.

¹⁰⁷ 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;47:380-6.

2.3.1. Protocolos de desinfección

La preparación del conducto radicular, mediante la instrumentación e irrigación, es una etapa esencial en el tratamiento endodóntico para eliminar o reducir la cantidad de microorganismos dentro del complejo sistema de conductos radiculares, así como para prevenir la recontaminación bacteriana en los dientes con periodontitis apical persistente¹⁰⁸. Diferentes soluciones irrigadoras y sus combinaciones pueden ser utilizadas, ya que ninguna solución única es capaz de disolver tejido orgánico, eliminar la capa de barrillo dentinario y prevenir la recolonización bacteriana durante un largo periodo de tiempo.

En un régimen de irrigación convencional, el NaClO es la principal solución utilizada durante la preparación y como solución irrigadora final tras el agente quelante, dada su potente acción antimicrobiana¹⁰⁹. La utilización de NaClO tras el agente quelante, en el protocolo de irrigación final, está basada en la mayor penetración y mejor acceso del agente antimicrobiano en los túbulos dentinarios¹¹⁰. Sin embargo, es conocido que el EDTA debilita la acción del NaClO al producir una disminución de la clorina libre¹¹¹ y que la irrigación con NaClO tras la utilización de EDTA produce una marcada erosión de la dentina del

¹⁰⁸ Ferrer-Luque CM, González-Castillo S, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT, Rodríguez-Archilla A, Baca P. Antimicrobial residual effects of irrigation regimens with maleic acid in infected root canals. *J Biol Res.* 2015;22:1.

¹⁰⁹ Siqueira Jr JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008;34:1291–301.

¹¹⁰ Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *J Endod.* 2011;37:1121-3.

¹¹¹ Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod.* 2005;31:817-820.

conducto radicular, debilitando la raíz, lo que podría contribuir a un mayor riesgo de fractura radicular vertical^{112,113}. Consecuentemente, el protocolo de irrigación recomendado para eliminar el barrillo dentinario es NaClO seguido de EDTA o ácido cítrico¹¹⁴, solos o combinados con CTR para incrementar la actividad antimicrobiana residual del agente quelante¹¹⁵.

En un régimen de irrigación alternado se utiliza un agente quelante alternado con NaClO durante la preparación del conducto radicular. En este sentido, Soares *et al.*¹¹⁶ mostraron una eliminación consistente y a largo plazo de *E. Faecalis* alternando una solución de EDTA al 17% con NaClO al 5,25%. Nakamura *et al.*¹¹⁷ concluyen que el uso alternado de ácido cítrico al 15% con NaClO al 1% durante la preparación químico-mecánica obtiene un nivel de desinfección similar al de una solución de NaClO al 5,25%. No obstante, estos protocolos tienen el inconveniente de la interacción química que se produce entre el NaClO y el agente quelante, por lo que no se recomiendan habitualmente.

¹¹² Qian W, Shen Y, Haapasalo M. Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *J Endod.* 2011;37:1437-1441.

¹¹³ Wang Z, Maezono H, Shen Y, Haapasalo M. Evaluation of root canal dentin erosion after different irrigation methods using energy-dispersive x-ray spectroscopy. *J Endod.* 2016;42:1834-1839.

¹¹⁴ Haapasalo M, Qian W, Shen Y. Irrigation: Beyond the smear layer. *Endodontic Topics.* 2012;27:35-53.

¹¹⁵ Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2012;38:826-8.

¹¹⁶ Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonça RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Júnior M et al. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2010;36:894-898.

¹¹⁷ Nakamura VC, Cai S, Candeiro GT, Ferrari PH, Caldeira CL, Gavini G. Ex vivo evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. *Int Endod.* 2013;46:217-224.

Una posible solución, para evitar interacciones en ambos protocolos, es usar un quelante que no interfiera con el NaClO, es decir, usar una solución combinada de ambos agentes.

2.3.2. Soluciones combinadas

El uso de diferentes soluciones irrigadoras durante la preparación del conducto radicular conlleva, en ocasiones, la interacción química entre sus componentes, impidiendo su uso combinado o consecutivo. La precipitación de los subproductos formados da lugar a una capa de “barrillo químico”¹¹⁸. La formación de este barrillo debe ser evitada, ya que además de su posible toxicidad periapical^{119,120}, interfiere en la óptima desinfección del conducto radicular, dificultando el paso de las soluciones irrigadoras al interior de los túbulos dentinarios. Además, dificulta la introducción de los selladores, impidiendo su penetración en los túbulos dentinarios en la fase de obturación¹²¹.

La combinación de NaClO con CLX forma un precipitado marrón-anaranjado de difícil eliminación¹²². Asimismo, la interacción entre el

¹¹⁸ Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J Endod.* 2010;36:847–850.

¹¹⁹ Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod.* 2007;33:966–969.

¹²⁰ Arslan H, Uygun AD, Keskin A, Karatas E, Seçkin F, Yıldırım A. Evaluation of orange-brown precipitate formed in root canals after irrigation with chlorhexidine and QMix and spectroscopic analysis of precipitates produced by a mixture of chlorhexidine/NaOCl and QMix/NaOCl. *Int Endod J.* 2015;48:1199–203.

¹²¹ Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J.* 2002;35:791–795.

¹²² Orhan EO, Irmak Ö, Hür D, Yaman BC, Karabucak B. Does para-chloroaniline really form after mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine?. *J Endod.* 2016;42:455–459.

Introducción

NaClO y agentes quelantes, como el ácido cítrico o las sales disódica y trisódica de EDTA, da lugar a la rápida pérdida de cloro disponible por parte del agente antimicrobiano. Esta pérdida genera una disminución de la capacidad de disolver tejido pulpar por parte del NaClO y parece ser más rápida en el caso del ácido cítrico, que con el uso de sales de EDTA^{123,124,125}. Del mismo modo, la CLX también interacciona con el EDTA, dando lugar a un precipitado blanco-lechoso altamente insoluble¹²⁶.

Por otra parte, la combinación de un agente quelante débil con NaClO como irrigante único, durante y después de la instrumentación, nos introduce en el concepto de “quelación continua” en la preparación de conductos radiculares. El ácido etidróico, también conocido como 1-hidroxi-etilideno-1, 1-bis-fosfonato o HEBP, es un quelante que puede combinarse con NaClO sin pérdida a corto plazo de las propiedades deseadas de ninguno de los compuestos^{127,128}. Soluciones mixtas de NaClO + HEBP han mostrado una capacidad similar al uso de NaClO seguido de EDTA para eliminar la capa de barrillo dentinario con

¹²³ Prado M, Santos Júnior HM, Rezende CM, Pinto AC, Faria RB, Simao RA et al. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *J Endod.* 2013;39:505–510.

¹²⁴ Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006;32:389–398.

¹²⁵ Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediaminetetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J.* 2003;36:411–415.

¹²⁶ Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod.* 2008;34:1521–1523.

¹²⁷ Girard S, Paque´ F, Badertscher M, Sener B, Zehnder M. Assessment of a gel-type chelating preparation containing 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate. *Int Endod J.* 2005;38:810–816.

¹²⁸ Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod.* 2005;31:817–820.

mínimos cambios en la dentina radicular¹²⁹. Además, esta combinación no interfiere con la capacidad del NaClO para matar biopelículas de *E. Faecalis* dentro de los túbulos dentinarios^{130,131}.

Asimismo, estudios recientes informan que la citotoxicidad y genotoxicidad de las soluciones mixtas de HEBP e NaClO están determinadas por la presencia de cloro libre disponible en ellas¹³² y su uso clínico no conlleva efectos adversos relacionados con la agregación del agente quelante¹³³. No obstante, la capacidad de disolución de tejidos por parte de NaClO se reduce ligeramente con el HEBP¹³⁴.

En éste sentido, un estudio reciente¹³⁵ ha investigado la eficacia de soluciones alcalinas de EDTANa₄ solas, al 10% y 20%, y combinadas con NaClO al 5%. Los resultados muestran que la capacidad de acción quelante de EDTANa₄ fue más lenta en la eliminación del barrillo dentinario que su forma trisódica (EDTANa₃), pero cuando se combinó con NaClO promovió eficazmente la disolución de materia orgánica y la

¹²⁹ 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.

¹³⁰ 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.

¹³¹ 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.

¹³² Ballal NV, Das S, Rao BSS, Zehnder M, Mohn D. Chemical, cytotoxic and genotoxic analysis of etidronate in sodium hypochlorite solution. *Int Endod J.* 2019;52:1228-1234.

¹³³ Ballal NV, Gandhi P, Shenoy PA, Belle VS, Bhat V, Rechenberg DK et al. Safety assessment of an etidronate in a sodium hypochlorite solution: randomized double-blind trial. *Int Endod J.* 2019;52:1274-1282.

¹³⁴ 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.

¹³⁵ Tartari T, Oda DF, Zancan RF, da Silva TL, de Moraes IG, Duarte MA et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J.* 2017;50:106-114.

Introducción

eliminación del barrillo dentinario. Aconsejan realizar la mezcla de las soluciones justo antes de su uso para evitar la reducción de cloro libre disponible. Por otra parte, se ha demostrado que soluciones de HEBP y EDTANa₄ causan una menor desmineralización de la dentina que una solución de EDTANa₃, y esta es concentración y tiempo dependiente¹³⁶.

¹³⁶ 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:e42-e54.

2.4. BIOCOMPATIBILIDAD DE SOLUCIONES IRRIGADORAS

La biocompatibilidad de los materiales endodónticos se caracteriza por muchos parámetros tales como citotoxicidad, genotoxicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad e histocompatibilidad. El empleo de pruebas *in vitro* ofrece la posibilidad de estudiar los efectos de la liberación de componentes de los materiales en sistemas celulares¹³⁷.

La citotoxicidad¹³⁸ está relacionada con el grado de acción destructiva específica que tiene un agente en las células. Los estudios de cultivo celular se utilizan desde hace más de 40 años para la investigación de las reacciones citotóxicas inducidas por los materiales de endodoncia¹³⁹. Líneas celulares tales como células 3T3 o L929 de embrión de ratón y células humanas primarias, principalmente fibroblastos, se usan para estos experimentos¹⁴⁰.

Entre las propiedades deseables de una solución irrigadora ideal, para su uso en el tratamiento endodóntico, es su baja o nula toxicidad. Es conocido que la eficacia antibacteriana y toxicidad del NaClO están relacionadas con su concentración. Concentraciones más altas tienen mayor capacidad antimicrobiana¹⁴¹ pero también mayor toxicidad¹⁴².

¹³⁷ Pertot WJ, Sindres V, Szekeres G, Proust JP. Model for quantitative Immunohisto-chemical assessment of pulpal response to biomaterials. J Biomed Mater Res. 1997;15:457-62.

¹³⁸ Peters OA. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. Int Endod J. 2013;46:195-7.

¹³⁹ Rappaport HM, Lilly GE, Kapsimalis P. Toxicity of endodontic filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1964;18:785-802.

¹⁴⁰ Al-Nazhan S, SpHngberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. J Endod. 1990;16:129-34.

¹⁴¹ Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. J Endod. 2005;31:471-3.

¹⁴² Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. J Endod. 1985;11:525-8.

Introducción

En este sentido, una concentración de NaOCl al 5,25% ha mostrado igual toxicidad que una concentración de CLX al 2% y mayor, para ambas soluciones, respecto a soluciones de EDTA al 17% y ácido cítrico al 10%¹⁴³.

Respecto a los agentes quelantes, diferentes estudios han comparado y determinado su citotoxicidad. Soluciones de EDTA al 17% han mostrado a corto plazo igual toxicidad sobre fibroblastos de ratón que soluciones de ácido cítrico a concentraciones del 10%, 15% y 25%. A largo plazo la toxicidad fue mayor para la solución de EDTA al 17% respecto a soluciones de ácido cítrico al 10% y 15%¹⁴⁴.

Una mayor viabilidad celular también fue encontrada para soluciones de ácido cítrico al 10% comparado con una solución de EDTA₄ al 17%¹⁴⁵. Asimismo, se demostró mediante un método para la cuantificación de la permeabilidad vascular¹⁴⁶, que soluciones de EDTA y ácido etilenglicol tetracético son más agresivas para los tejidos que soluciones de ácido cítrico, y que el ácido cítrico al 15% posee menor toxicidad en cultivos de macrófagos murinos que el EDTA al 17%¹⁴⁷.

Por otra parte, la extrusión apical de EDTA durante la terapia del conducto radicular podría modificar la interacción del péptido

¹⁴³ Prado M, Silva EJ, Duque TM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. *J Appl Oral Sci.* 2015;23:158-63.

¹⁴⁴ Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod.* 2005;31:746-8.

¹⁴⁵ Scelza MF, Antoniazzi JH, Scelza P. Efficacy of final irrigation - a scanning electron microscopic evaluation. *J Endod.* 2000;26:355-8.

¹⁴⁶ Sousa SM, Bramante CM, Taga EM. Biocompatibility of EDTA, EGTA and citric acid. *Braz Dent J.* 2005;16:3-8.

¹⁴⁷ Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *Int Endod J.* 2007;40:338-43.

vasoactivo intestinal con los macrófagos¹⁴⁸, modulando los mecanismos inflamatorios implicados en las lesiones periapicales. Además, puede causar descalcificación del hueso periapical y tener efectos adversos en el sistema inmune al inhibir la función de los macrófagos y reducir la reacción inflamatoria periapical¹⁴⁹. En este sentido, se evaluó *in vitro* la expresión de las concentraciones de óxido nítrico por macrófagos peritoneales después del contacto con diferentes soluciones quelantes (MTAD[®], Tetraclean[®], Smear Clear[®]) y EDTA. Todas las soluciones mostraron efectos proinflamatorios severos sobre los macrófagos cultivados en ratones, no obstante, las soluciones basadas en ácido cítrico indujeron una liberación menor de óxido nítrico que las basadas en EDTA¹⁵⁰.

Cuando se comparó la citotoxicidad en fibroblastos de ratón de diferentes diluciones realizadas a partir de ácido cítrico al 15% y ácido fosfórico al 5% con NaClO al 2,5%, el mayor porcentaje de viabilidad celular se obtuvo con diluciones al 0,1% y 0,5% de NaClO al 2,5%. Los porcentajes más bajos se obtuvieron con diluciones al 0,5% de ácido fosfórico al 5% y ácido cítrico al 15%¹⁵¹. En este sentido, soluciones de NaClO al 3%, CLX al 2% y MTAD indujeron citotoxicidad en

¹⁴⁸ Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez A, Llamas R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. *J Endod.* 1996;22:337-340.

¹⁴⁹ Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages: Endodontic implications. *J Endod.* 1997;23:205-208.

¹⁵⁰ Pappen FG, Souza EM, Giardino L, Carlos IZ, Leonardo MR, de Toledo Leonardo R. Endodontic chelators induce nitric oxide expression by murine-cultured macrophages. *J Endod.* 2009;35:824-8.

¹⁵¹ Navarro-Escobar E, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15:e90-4.

Introducción

fibroblastos de ligamento periodontal de rata, y estos efectos dependieron del tiempo y de la dosis. La viabilidad celular fue significativamente mayor a las 72 horas que a 1 y 24 horas para todos los irrigantes. NaClO y MTAD fueron moderadamente citotóxicos, mientras que CLX fue perjudicial para la viabilidad celular en todos los tiempos¹⁵².

Un estudio reciente confirma resultados previos, mostrando mayor toxicidad de CLX seguido de NaClO y menor para EDTA sobre una línea celular de fibroblastos humanos de pulmón. La combinación de los irrigantes no produjo un aumento significativo de su citotoxicidad¹⁵³.

¹⁵² Bajrami D, Hoxha V, Gorduysus O, Muftuoglu S, Zeybek ND, Küçükkaya S. Cytotoxic effect of endodontic irrigants in vitro. *Med Sci Monit Basic Res.* 2014;20:22-6.

¹⁵³ Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2016;49:764-73.

Justificación

El éxito del tratamiento endodóntico implica una adecuada limpieza y desinfección del complejo sistema de conductos radiculares. El enfoque actual se centra en eliminar el tejido orgánico inflamado o necrótico, así como la capa de barrillo dentinario y las biopelículas presentes en su interior¹⁵⁴. Posteriormente, la pared del conducto se puede acondicionar para mejorar la unión con los materiales de relleno¹⁵⁵ o para favorecer la liberación de factores de crecimiento en la terapia endodóntica regenerativa¹⁵⁶.

En el tratamiento endodóntico se usan soluciones irrigadoras antimicrobianas como NaClO para disolver el tejido vital o necrótico y reducir o minimizar la microbiota presente en el sistema de conductos radiculares. La necesidad de usar agentes quelantes durante la preparación está determinada por la formación del barrillo dentinario en las paredes instrumentadas del conducto radicular¹⁵⁷ y la acumulación de restos de tejido duro en áreas no instrumentadas¹⁵⁸.

Los protocolos de irrigación recomendados incluyen el uso de agentes quelantes durante¹⁵⁹ o al final de la preparación¹⁶⁰. Entre ellos, el EDTA

¹⁵⁴ 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.

¹⁵⁵ Rodríguez-Martínez JB, González-Rodríguez MP, González-López S, Ferrer-Luque CM. Influence of adhesive systems on microtensile bond strength of resin-based endodontic sealers to the root dentin. *J Clin Exp Dent*. 2014;6:e203-8.

¹⁵⁶ Galler K, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerinnk JD, Hecker S et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod* 2011;37:1536-41.

¹⁵⁷ Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *J Endod*. 2006;32:993-7.

¹⁵⁸ Paqué F, Al-Jadaa A, Kfir A. Hard-tissue debris accumulation created by conventional rotary versus self-adjusting file instrumentation in mesial root canal systems of mandibular molars. *Int Endod J*. 2012;45:413-8.

¹⁵⁹ Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *J Endod*. 2006;32:993-7.

es el más ampliamente utilizado por su capacidad para remover el barrillo dentinario¹⁶¹, aumentar la resistencia de unión de selladores basados en resina epóxica y metacrilato a las paredes del conducto radicular^{162,163} y permitir la liberación de factores de crecimiento de la dentina¹⁶⁴. No obstante, su capacidad antimicrobiana es reducida y se atribuye a su capacidad de remoción y arrastre de la capa residual. En este sentido, se ha demostrado que la combinación de EDTA con CTR, un agente surfactante, aumenta su actividad antimicrobiana residual en conductos radiculares infectados con *E. faecalis*¹⁶⁵.

Recientemente, para favorecer la eliminación de restos orgánicos e inorgánicos durante la preparación, se ha propuesto la combinación de un agente quelante alcalino con NaClO. En el nuevo concepto de “quelación continua”¹⁶⁶ los efectos proteolíticos y antibacterianos del NaClO se mantienen¹⁶⁷ a la vez que se previene la formación de barrillo dentinario y la acumulación de restos inorgánicos en áreas inaccesibles a la instrumentación.

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

¹⁶¹ Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. Int Endod J. 2010;43:2-15.

¹⁶² Neelakantan P, Subbarao C, Subbarao CV, De-Deus G, Zehnder M. The impact of root dentine conditioning on sealing ability and push-out bond strength of an epoxy resin root canal sealer. Int Endod J. 2011;44:491-8.

¹⁶³ Vilanova WV, Carvalho-Junior JR, Alfredo E, Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YT. Effect of intracanal irrigants on the bond strength of epoxy resin-based and methacrylate resin-based sealers to root canal walls. Int Endod J. 2012;45:42-8.

¹⁶⁴ Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, Chebrolu HP, Alzebedeh D, Badi MA et al. Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics. J Endod. 2016;42:1760-1766.

¹⁶⁵ Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2012;38:826-8.

¹⁶⁶ Neelakantan P, Varughese AA, Sharma S, Subbarao CV, Zehnder M, De Deus G. Continuous chelation irrigation improves the adhesion of epoxy resin-based root canal sealer to root dentine. Int Endod J. 2012;45:1097-102.

¹⁶⁷ 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.

Por otra parte es conocido que un irrigante ideal para el conducto radicular no debe ser tóxico. La biocompatibilidad de las soluciones irrigadoras es importante, ya que pueden entrar en contacto con los tejidos perirradiculares y no deben obstaculizar el proceso de curación de la región apical. Establecer por tanto la biocompatibilidad y seguridad en el uso de las soluciones y sus combinaciones farmacológicas es una necesidad en la terapia endodóntica.

Entre otros, debe evaluarse la citotoxicidad¹⁶⁸, parámetro relacionado con el grado en que un agente tiene una acción destructiva específica en ciertas células. En éste sentido, las nuevas propuestas de soluciones irrigadoras combinadas requieren la determinación de su posible toxicidad.

¹⁶⁸ Peters OA. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J.* 2013;46:195-7.

Objetivos e

Hipótesis

Por lo anteriormente expuesto, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar y comparar la actividad antimicrobiana y la citotoxicidad de soluciones de NaClO al 2,5% y EDTANa₄.

Los **objetivos específicos** planteados son:

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de soluciones alcalinas de NaClO al 2,5% y EDTANa₄ al 10% y 20% frente a biopelículas de *E. faecalis*.
2. Determinar la actividad antimicrobiana de soluciones de EDTANa₄ combinadas con NaClO al 2,5%, con y sin la adición de CTR al 0,2%, frente a biopelículas de *E. faecalis*.
3. Evaluar la citotoxicidad de las soluciones ensayadas sobre HPF.

Asimismo, se establecieron las siguientes **hipótesis nulas**:

1. Soluciones alcalinas de EDTANa₄ a diferentes concentraciones poseen similar actividad antimicrobiana frente a biopelículas de *E. faecalis*.
2. La actividad antibiopelícula de soluciones combinadas de EDTANa₄ con NaClO, con o sin la adición de CTR, es similar.
3. La citotoxicidad de soluciones de EDTANa₄, solas o combinadas con NaClO, con o sin la adición de CTR, es similar a la de una solución de NaClO al 2,5%.

Material y

Métodos

5.1. EFICACIA ANTIMICROBIANA DE SOLUCIONES IRRIGADORAS

El protocolo de este trabajo ha sido aprobado por el comité de ética de la Universidad de Granada (UGR-438).

5.1.1. Selección y preparación de la muestra

Se seleccionaron 40 dientes unirradiculares humanos con un único conducto y extraídos recientemente. Tras un raspado inicial con una cureta Gracey nº 5/6 (Hu-Friedy Mfg. Co., Leimen, Alemania) para eliminar mecánicamente detritus y restos de tejido, los dientes fueron conservados y almacenados hasta su utilización en una solución de timol al 0,1% a 4 °C. Antes de ser utilizados, los dientes se lavaron con agua destilada para eliminar la solución de conservación y se introdujeron en un baño de ultrasonidos (Branson Ultrasonics Corporation, modelo 5510E-MT, Danbury, CT, EE.UU.) durante 4 minutos.

5.1.2. Preparación de las unidades volumétricas de dentina (UVDs)

Los dientes fueron seccionados, con una máquina de corte Accuton-50 (Struers, Copenhagen, Denmark) a una velocidad de 3.200 rpm e irrigación abundante de agua. Se descartaron los tercios medio y apical de la raíz y la corona dentaria para obtener segmentos de 4 mm de dentina del tercio coronal radicular. Seguidamente, los segmentos fueron cortados siguiendo la luz del conducto radicular, consiguiéndose dos mitades de cada uno de ellos.

Material y Métodos

El cemento radicular de cada bloque se eliminó mediante pulido, hasta obtener una superficie plana, y la cara interna fue pulida con papel de carburo de silicio de 150, 220, 500 y 800 grit en orden ascendente, hasta conseguir 2 especímenes por diente de 4×4×0,7 mm (Figuras 3 y 4).

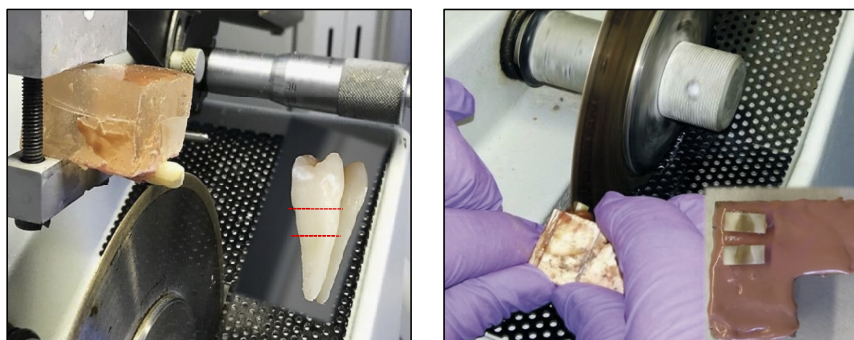


Figura 3. Preparación de los especímenes radiculares.

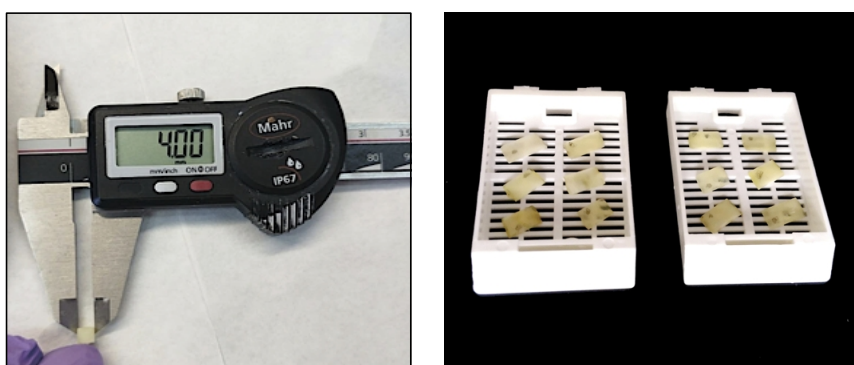


Figura 4. Obtención de las UVDs.

El barrillo dentinario formado durante la preparación de los bloques de dentina se eliminó sumergiéndolos en EDTA al 17% durante 5 minutos y posteriormente lavándolos inmediatamente con SS durante 10 minutos.

A continuación, cada una de las dos mitades radiculares se asignó aleatoriamente a los diferentes grupos de estudio. El número total de UVDs/grupo fue de 10. Los especímenes fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y se incubaron en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (ScharlauChemie SA, Barcelona, Spain) durante 24 horas a 37 °C, para asegurar que no había contaminación bacteriana. Finalmente, se conservaron en SS estéril hasta su utilización.

5.1.3. Preparación de las soluciones y grupos de estudio

Las soluciones se prepararon el mismo día que se realizó cada experiencia, con un tiempo máximo previo a su uso de 60 minutos. Todas las diluciones fueron realizadas con agua destilada estéril. Las soluciones irrigadoras preparadas fueron NaClO al 2,5%, 5% y 7,5% (Panreac Química SA, Castellar del Vallés, Spain), EDTANa₄ al 30%, 20%, 15% y 10% (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) y CTR (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) al 0,6%.

A partir de estas, las soluciones que conformaron los grupos de estudio se combinaron y 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).

Los grupos de estudio (n=10/grupo) fueron (Tabla 1):

1. NaClO 2,5%
2. EDTANa₄ 10%
3. EDTANa₄ 20%
4. NaClO 5% + EDTANa₄ 10% mezclados a partes iguales, resultando una solución de NaClO 2,5% + EDTANa₄ 5%.
5. NaClO 5% + EDTANa₄ 20% mezclados a partes iguales, resultando una solución de NaClO 2,5% + EDTANa₄ 10%.
6. NaClO 7,5% + EDTANa₄ 15% + CTR 0,6% mezclados a partes iguales, resultando una solución de NaClO 2,5% + EDTANa₄ 5% + CTR 0,2%.
7. NaClO 7,5% + EDTANa₄ 30% + CTR 0,6% mezclados a partes iguales, resultando una solución de NaClO 2,5% + EDTANa₄ 10% + CTR 0,2%.
8. Control de SS al 0.9%.

Tabla 1. Grupos de estudio.

GRUPOS	SOLUCIONES IRRIGADORAS
Grupo 1	NaClO 2,5%
Grupo 2	EDTANA ₄ 10%
Grupo 3	EDTANA ₄ 20%
Grupo 4	NaClO 2,5% + EDTANA ₄ 5%
Grupo 5	NaClO 2,5% + EDTANA ₄ 10%
Grupo 6	NaClO 2,5% + EDTANA ₄ 5% + CTR 0,2%
Grupo 7	NaClO 2,5% + EDTANA ₄ 10% + CTR 0,2%
Grupo 8	SS 0,9%

5.1.4. Infección de la dentina

La cepa bacteriana utilizada en este estudio fue *E. faecalis* ATCC 29212. Fue tomada de un cultivo de reserva a 4 °C y se sembró dos veces en placas de agar BHI (ScharlauChemie SA, Barcelona, España) que se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Desde un subcultivo de *E. faecalis*, se preparó una suspensión estándar de 1 de McFarland en caldo BHI y se diluyó 30 veces hasta obtener una suspensión bacteriana de aproximadamente 1×10^7 UFCs/ml.

Las UVDs se introdujeron en placas de microtiter de 24 pocillos inoculadas con 200 µL de la suspensión microbiana y 1,8 ml de caldo BHI estéril (Figura 5). Las placas se incubaron a 37 °C durante 3 semanas en una mesa de balanceo. El medio BHI fue

refrescado dos veces a la semana para asegurar el crecimiento de las biopelículas.

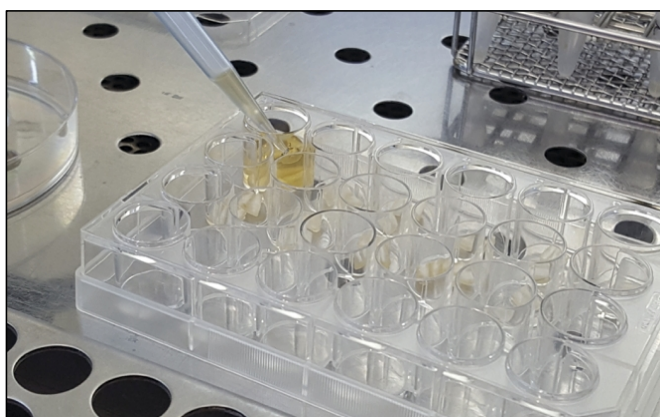


Figura 5. Infección de las UVDs.

Transcurrido el tiempo se procedió a lavar las UVDs en 120 μ l de SS durante 2 minutos para eliminar las bacterias que no estuviesen fuertemente adheridas a las biopelículas.

5.1.5. Test de actividad antimicrobiana frente a biopelículas de *E. faecalis*

La actividad antimicrobiana se determinó utilizando una placa de microtiter de 96 pocillos que contenían 120 μ l/pocillo de las soluciones antimicrobianas. Las UVDs con las biopelículas ya lavadas fueron secadas con papel absorbente estéril, introducidas en los pocillos y mantenidas en contacto con las soluciones durante 3 minutos. Una solución de tiosulfato sódico al 5% fue utilizada durante 5 minutos para neutralizar el NaClO en los grupos 1, 4, 5, 6 y 7. Posteriormente, se volvieron a lavar con SS durante 1 minuto y se secaron para eliminar cualquier exceso de la solución.

A continuación, se colocaron en eppendorf con 300 μl de caldo BHI, se agitaron en un vortex durante 10 segundos y se sometieron a sonicación durante 10 minutos para asegurar la recuperación de las biopelículas. Con el grupo control se siguió un procedimiento similar, excepto que no había exposición a ningún antimicrobiano.

La viabilidad celular se evaluó mediante recuentos de UFCs y bioluminiscencia, con el método de ATP (Figuras 6 y 7).

Para el recuento de UFCs, de la suspensión de las biopelículas recuperadas se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . De estas diluciones se sembraron gotas de 10 μl en placas de agar BHI, que se incubaron a 37 °C durante 48 horas y se hicieron recuentos de células viables (UFCs).

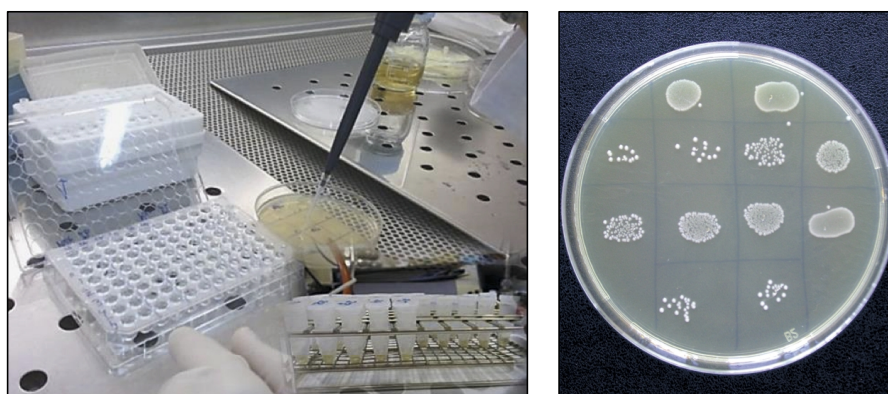


Figura 6. Test de actividad antimicrobiana (UFCs)

Los niveles de ATP contenidos en la suspensión de las biopelículas recuperadas se evaluaron con el kit de ensayo de viabilidad celular microbiana BacTiterGlo (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El reactivo se basa en las propiedades de

Material y Métodos

una luciferasa termoestable (Luciferasa Recombinante Ultra-Glo™) para extraer el ATP de las bacterias. La formulación del reactivo determina la lisis de las células bacterianas y la generación de luz cuantificable. La señal luminiscente corresponde a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. Para ello, 100 µl de la suspensión bacteriana se añadieron a 100 µl del reactivo BacTiterGlow en una placa opaca de microtiter de 96 pocillos (Greiner, Monroe, NC) seguido de incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. La luminiscencia producida como ULRs fue estimada mediante un luminómetro (GloMax, Promega) en los servicios de instrumentación científica de la Universidad de Granada.



Figura 7. Test de bioluminiscencia (ATP)

Adicionalmente se inocularon 20 UVDs con BHI estéril: 4 sirvieron para el control de la esterilidad durante todo el experimento y 16 muestras, dos por cada grupo de estudio, para validar el crecimiento bacteriano y la eficacia de las diferentes soluciones mediante microscopía.

5.1.6. Microscopía láser confocal (MLC)

La observación de las biopelículas formadas en las UVDs se realizó con MLC. Se utilizó el kit LIVE/DEAD® (BacLight™; Invitrogen, Eugene, OR, USA) que permite evaluar la integridad de la membrana de las células de la biopelícula. Contiene dos componentes fluorescentes, A y B, consistentes en SYTO-9 y yoduro de propidio (YP), respectivamente. SYTO-9 es un colorante fluorescente verde, que tiñe los ácidos nucleicos, independientemente de si los microorganismos están vivos o muertos. El YP es un colorante rojo fluorescente que sólo tiñe células con la membrana citoplasmática dañada (microorganismos muertos). Después de la tinción de las muestras con una mezcla 1:1 de SYTO-9 y YP durante 15 minutos, a temperatura ambiente y protegidas de la luz, se lavaron con SS y fueron montadas sobre placas 60µ-Dish (Ibidi, Martinsried, Germany) con aceite de montaje (BacLight™, Invitrogen) para su observación directa utilizando un microscopio láser confocal (Leica TCS-SP5 II, Mannheim, Alemania) en el servicio de instrumentación científica de la Universidad de Granada (Figura 8).

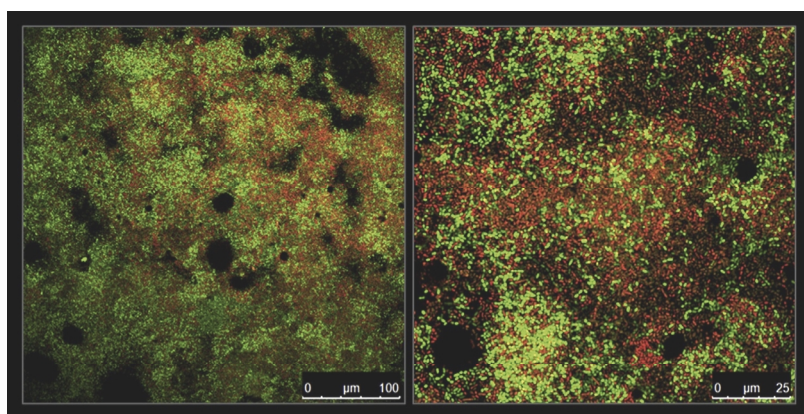


Figura 8. Imágenes representativas del crecimiento bacteriano con MLC

5.1.7. Variables estudiadas y Análisis estadístico

Los resultados de los recuentos bacterianos se expresaron como Log_{10} (UFCs + 1)/ml. Los resultados de la actividad antimicrobiana de las diferentes soluciones del test ATP obtenidos por bioluminiscencia se expresaron como ULRs en valor absoluto y cómo porcentaje de reducción de cada grupo con respecto al control con la siguiente fórmula: $(1 - [\text{ULRs test} / \text{media ULRs control}]) \times 100$.

En los recuentos bacterianos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para confirmar que los datos seguían una distribución normal. Antes de analizar los resultados se aplicó la transformación de Anscombe a los porcentajes de reducción de las ULRs. La eficacia de las soluciones se determinó mediante ANOVA de una vía para comparaciones múltiples y el test de Duncan para determinar las soluciones que tenían un comportamiento similar.

En los grupos con crecimiento positivo, se calculó el coeficiente de correlación lineal de Pearson r ($-1 \leq r \leq 1$) entre \log_{10} (UFCs + 1) y ULRs, así como su cuadrado, el coeficiente de determinación lineal r^2 ($0 \leq r^2 \leq 1$).

El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

5.2. BIOCOMPATIBILIDAD DE SOLUCIONES IRRIGADORAS

5.2.1. Citotoxicidad de soluciones irrigadoras

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Granada (783 / CEIH / 2019).

Para evaluar la citotoxicidad de las soluciones irrigadoras se utilizaron HPF (HPF, ScienCell Research Laboratories) (Figura 9).

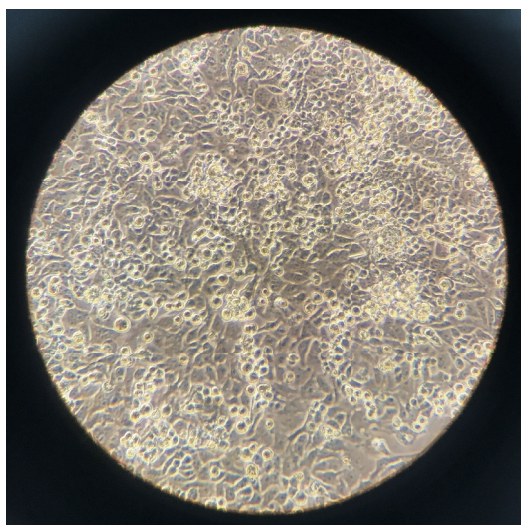


Figura 9. Imagen de microscopía óptica de HPF.

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar (Gabinete de Seguridad Biológica LabGard ES 425, NuAire®).

Las células se cultivaron en medio Eagle's modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 2 mM de glutamina, 100 mg/ml de estreptomicina y 100 mg/ml de penicilina (Figura 10).

Material y Métodos

Para evitar cambios en el pH del medio se agregó tampón Hepes (pH 7.2) a una concentración final de 2 mM. Las células se mantuvieron en una estufa de cultivo, a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.



Figura 10. HPF en DMEM suplementado con suero fetal bovino.

Una vez alcanzada la confluencia celular, se retiró el medio de cultivo y las células fueron despegadas mediante una solución de EDTA (EDTA 0,5 mM, pH 8,0 en PBS) durante 5 minutos. A continuación, se extrajo la solución de EDTA conteniendo las células, se añadió PBS y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. El sedimento se resuspendió en DMEM suplementado.

El recuento de células se realizó en una cámara de Neubauer BLAUBRAND® (BRAND, GMBH, Alemania) en un microscopio Olympus IM (Japón) con contraste de fases (Figura 11).

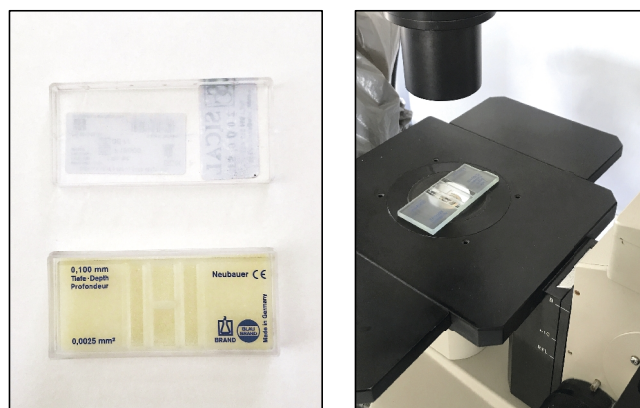


Figura 11. Recuento en cámara de Neubauer

Las células en medio de cultivo se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (JET BIOFIL®, Guangzhou, China) a una concentración de 10^4 células/pocillo y se incubaron 24 horas, en el medio de cultivo, para permitir la adherencia celular al fondo de los pocillos. Las soluciones testadas, las mismas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana, fueron preparadas inmediatamente antes de su uso (Figuras 12 y 13).

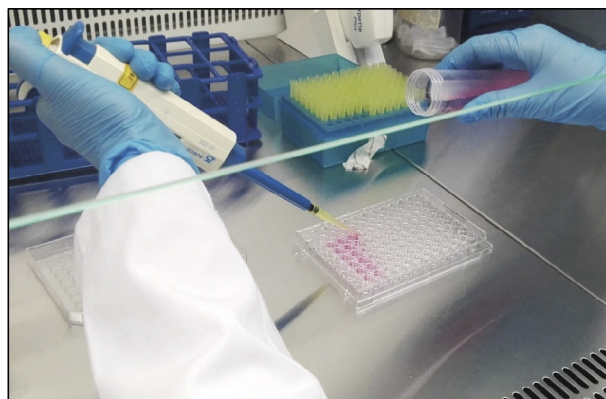


Figura 12. Siembra celular.

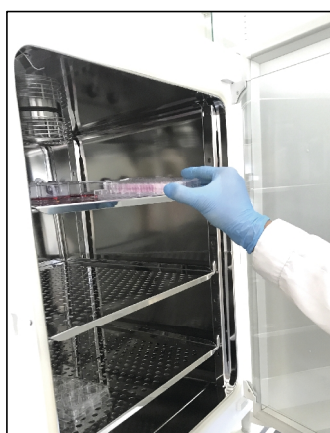


Figura 13. Incubación 24 horas.

Transcurridas 24 horas el medio de cada pocillo fue aspirado y reemplazado con 100 μl de cada una de las soluciones de estudio (Figura 14). Se utilizaron tres pocillos para la replica de cada grupo y se evaluaron sus efectos en tiempos de 1 y 24 horas. Tras la exposición a las diferentes soluciones (100 μl) y al control: medio de cultivo celular (DMEM) se eliminó el contenido de los pocillos.

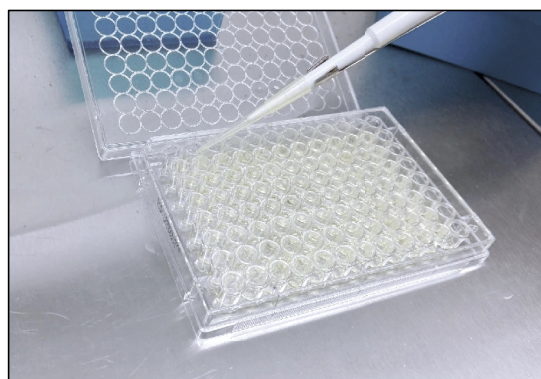


Figura 14. Exposición a las soluciones irrigadoras.

Para determinar la viabilidad/metabolismo de las células en contacto con las soluciones, se usó el ensayo MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Después de la eliminación de las soluciones, las células se incubaron con 10 μ l de una solución de MTT-succinato (0,5 mg/ml; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 4 horas. Los cristales de formazan, producidos dentro de las células, se disolvieron usando 100 μ l/pocillo de isopropanol acidificado (isopropanol con HCl 0,04N).

A continuación, se midió la absorbancia a 570 nm (Abs570) utilizando un lector de microplacas (FLUOstar® Optima) (Figura 15). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces para asegurar la reproducibilidad.



Figura 15. Medida de la densidad óptica (DO).

5.2.2. Variables estudiadas y Análisis estadístico

El porcentaje de viabilidad celular se calculó dividiendo los valores de absorbancia de los pocillos experimentales con los obtenidos de los pocillos del grupo control y multiplicando por 100 mediante la siguiente fórmula: Viabilidad (%) = Media DO solución / Media DO control x 100.

Para el análisis de los resultados se procedió a convertir los porcentajes en proporciones (tanto por uno) dividiéndolos por 100, y, a continuación, se realizó la transformación “logit” sobre proporciones p con objeto de normalizar las variables: $p = \ln(p/1-p)$.

En cada tiempo la comparación global entre grupos se realizó mediante el test de Welch debido a la no igualdad de las varianzas determinada por el test de Levene y para determinar las agrupaciones en cada tiempo se aplicó el test de Games-Howell.

La comparación entre tiempos en cada uno de los grupos se realizó con el test de la t de Student.

El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$ y los análisis se realizaron mediante el software SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Resultados

6.1. EFICACIA ANTIMICROBIANA DE SOLUCIONES IRRIGADORAS

Los resultados de las UFCs y bioluminiscencia se muestran en la Tabla 1.

La determinación lineal del coeficiente entre ULRs y $\log_{10} (\text{UFCs} + 1)$ en los grupos con crecimiento positivo fue $r^2 = 72,8\%$ ($r = 0,853$), con un valor de $p < 0,001$.

En los grupos en los que estaba presente NaClO no hubo ningún crecimiento bacteriano. La menor eficacia antimicrobiana la mostraron los grupos EDTANa₄, en los cuales no se obtuvo erradicación y la reducción logarítmica no alcanzó en ningún caso 2 unidades. Todos los controles de esterilidad no mostraron ningún crecimiento bacteriano.

Respecto a la bioluminiscencia, hubo una reducción de ULRs similar en todos los grupos de estudio que contenían NaClO, el porcentaje de reducción fue inferior y estadísticamente significativo respecto al control y los demás grupos de estudio.

La comparación entre EDTANa₄ al 10% frente al 20% mostró una relación concentración-dependiente inversa en ambos test ensayados.

En la figura 12 se muestran imágenes representativas de microscopía láser confocal de los diferentes grupos de estudio.

TABLA 1. Actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras frente a biopelículas de *E. faecalis* determinada mediante bioluminiscencia (ATP) y unidades formadoras de colonias (UFCs). Media y desviación estándar, n=10/grupo.

GRUPOS	ATP		UFCs	
	Unidades de luz relativa (ULRs)	% de reducción*	Log ₁₀ (UFCs + 1)/ml	
1 NaClO 2,5%	19.858,80 (9.635,16) ^a	93,59 (3,10) ^a	0	
2 EDTANa ₄ 10%	42.131,50 (15.444,25) ^b	86,41 (4,98) ^b	4,53 (0,37) ^a	
3 EDTANa ₄ 20%	88.157,80 (22.194,61) ^c	71,56 (7,16) ^c	5,16 (0,59) ^b	
4 NaClO 2,5% + EDTANa ₄ 5%	20.183,10 (3.319,98) ^a	93,49 (1,07) ^a	0	
5 NaClO 2,5% + EDTANa ₄ 10%	18.047,10 (3.657,55) ^a	94,18 (1,18) ^a	0	
6 NaClO 2,5% + EDTANa ₄ 5% + CTR 0,2%	19.712,00 (5.258,66) ^a	93,64 (1,69) ^a	0	
7 NaClO 2,5% + EDTANa ₄ 10% + CTR 0,2%	15.764,50 (2.828,39) ^a	94,91 (0,10) ^a	0	
8 SS 0,9%	309.996,20 (51.261,99) ^d	-	6,36 (0,34) ^c	

* Antes de la comparación los datos fueron sometidos a la transformación de Anscombe.

Comparación global entre grupos mediante ANOVA ($p < 0,001$). Leído verticalmente, las mismas letras en superíndice no muestran diferencias estadísticamente significativas determinadas con el test de Duncan. NaClO: hipoclorito de sodio, EDTANa₄: EDTA tetrasódico; CTR: cetrinida; SS: solución salina

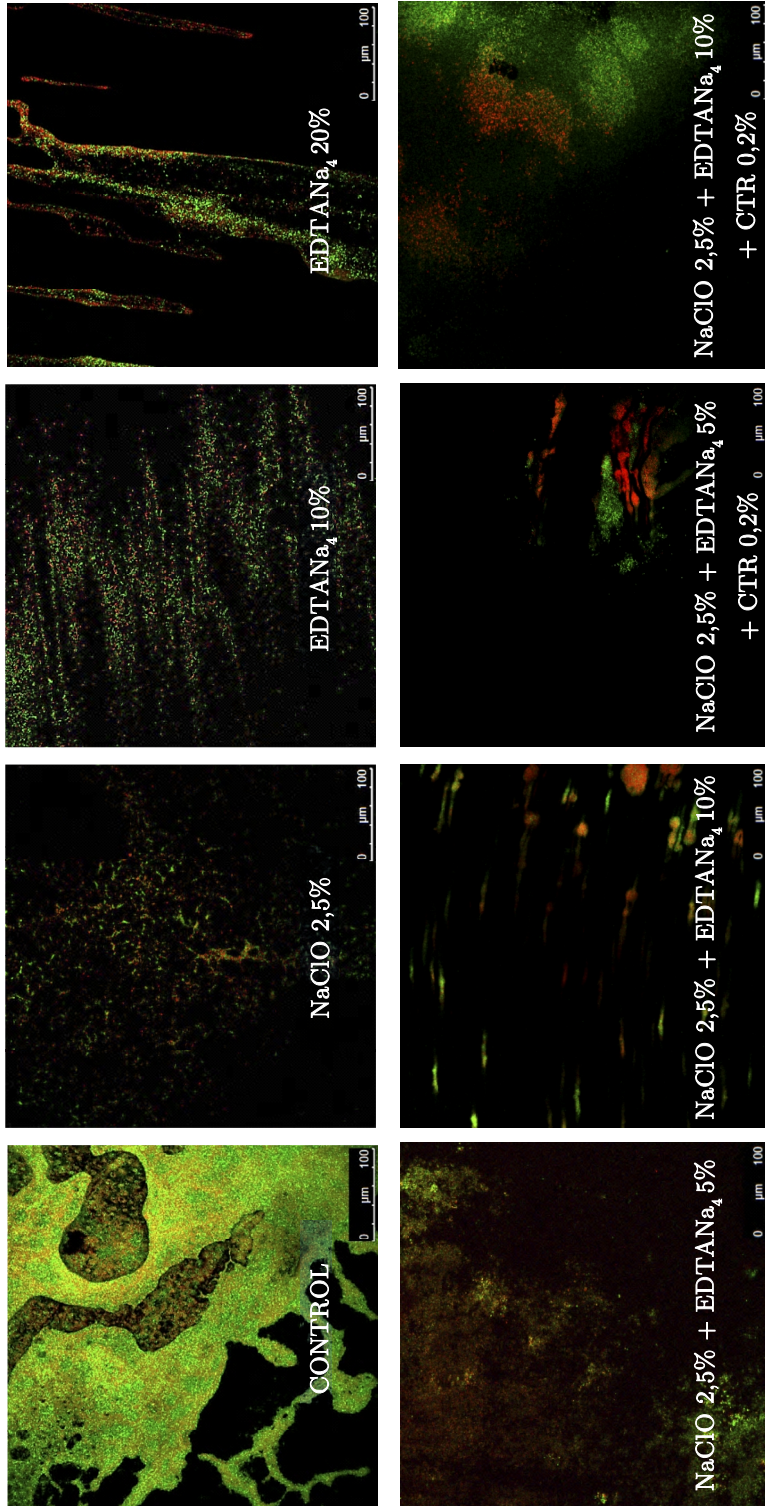


Figura 12. Imágenes con MLC representativas de los grupos de estudio.

6.2. BIOCMPATIBILIDAD DE SOLUCIONES IRRIGADORAS

Citotoxicidad de soluciones irrigadoras

Los resultados de la citotoxicidad sobre la línea celular HPF para los tiempos evaluados se muestran en las Tabla 2.

La media y la desviación estándar de la DO de los controles a 1 y 24 horas fueron, respectivamente, 0,6145 (0,0457) y 0,7194 (0,0816). Posteriormente, a partir de estos valores, se calcularon los porcentajes de viabilidad de cada uno de los grupos.

Para ambos períodos, la solución de NaClO al 2,5% obtuvo la viabilidad más baja, con diferencias estadísticamente significativas. Después de 1 hora de exposición, la solución EDTANa₄ al 20% obtuvo el mayor porcentaje de viabilidad, sin diferencias significativas respecto a la solución de EDTANa₄ al 10% y a la combinación de NaClO 2,5% + EDTANa₄ 10% + CTR 0,2%. La solución de NaClO 2,5% + EDTANa₄ 5% mostró el segundo porcentaje más bajo de viabilidad celular, el único que no mostró diferencias con respecto al NaClO al 2,5%. Las soluciones de EDTANa₄ 10%, NaClO 2,5% + EDTANa₄ 10% e NaClO 2,5% + EDTANa₄ 5% + CTR 0,2% mostraron porcentajes de viabilidad similares (respectivamente 60,62%, 55,42% y 55,95%).

Después de 24 horas, la viabilidad celular se redujo en todos los grupos de estudio con la excepción del grupo NaClO al 2,5% + EDTANa₄ 5%, que fue la mezcla más citotóxica en ambos tiempos después del NaOCl (Figura 1). EDTANa₄ al 20% obtuvo los valores más bajos, pero sin diferencias significativas con respecto a los otros grupos, excepto NaClO.

La adición de CTR a las soluciones mostró una ligera mejora de la viabilidad celular en ambos tiempos de estudio.

En la Figura 13 se muestra de forma gráfica y para cada grupo, el porcentaje de viabilidad celular después de la exposición a las soluciones durante 1 y 24 horas, así como los grupos que mostraron diferencias significativas entre ambos tiempos.

TABLA 2. Porcentaje de viabilidad de HPF determinado mediante DO después de los tiempos de contacto con las soluciones irrigadoras. Media (desviación estándar), n = 9/grupo.

GRUPOS	% VIABILIDAD		**Comparación Valor de p
	1 hora	24 horas	
1 2,5% NaClO	27,75 (0,79) ^a	20,97 (0,63) ^a	<0,001
2 EDTANa ₄ 10%	60,62 (11,40) ^{b,c}	44,11 (8,97) ^b	0,004
3 EDTANa ₄ 20%	73,52 (5,50) ^c	54,76 (10,33) ^b	<0,001
4 NaClO 2,5% + EDTANa ₄ 5%	40,39 (11,10) ^{a,d}	41,47 (3,10) ^b	0,724
5 NaClO 2,5% + EDTANa ₄ 10%	55,42 (10,35) ^{b,d}	43,05 (6,72) ^b	0,008
6 NaClO 2,5% + EDTANa ₄ 5% + CTR 0,2%	55,95 (11,03) ^{b,d}	44,75 (5,49) ^b	0,016
7 NaClO 2,5% + EDTANa ₄ 10% + CTR 0,2%	70,44 (19,38) ^{b,c}	46,53 (4,72) ^b	0,011
*Comparación, valor de p	<0,001	<0,001	

Comparación global entre grupos por el test de Welch, sometiendo previamente los datos a la transformación Logit. Leído verticalmente las mismas letras en superíndice no muestran diferencias estadísticamente significativas determinadas con la prueba Games-Howell. ** Comparación entre tiempos con el test T de Student. NaClO: hipoclorito de sodio, EDTANa₄: EDTA tetrasódico; CTR: cetrimida

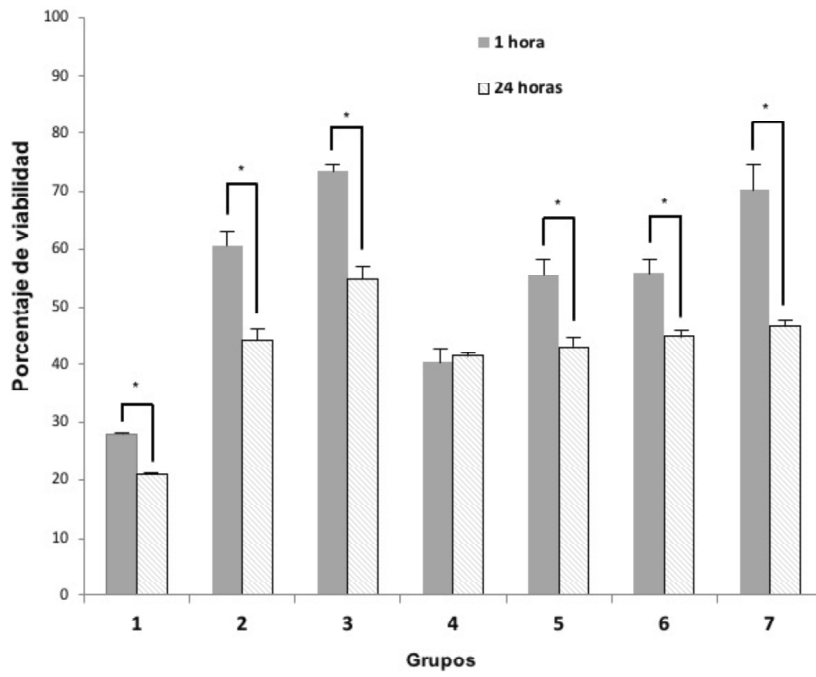


Figura 13. Media del porcentaje de viabilidad celular después de 1 y 24 horas de exposición a las soluciones irrigadoras. *Diferencias estadísticamente significativas entre tiempos.

Discusión

El uso de soluciones irrigadoras es esencial en el tratamiento endodóntico porque ayudan a eliminar los detritus, disolver el tejido orgánico e inorgánico y son fundamentales para la desinfección del complejo sistema de conductos radiculares.

La elección de una solución de irrigación adecuada siempre debe tener en cuenta su biocompatibilidad. La lesión química ocurre cuando un tejido vital se expone a soluciones que no son compatibles con el metabolismo celular. La lesión puede variar de leve a grave, es decir, de una alteración en el metabolismo y la función de la célula hasta el cese completo de toda la actividad, que termina en la muerte celular¹⁶⁹.

Actividad antimicrobiana

E. faecalis es una especie comúnmente aislada en casos de periodontitis apical persistente¹⁷⁰. Su supervivencia a largo plazo está determinada por su capacidad de formar biopelículas e invadir los túbulos dentinarios¹⁷¹, incluso en situaciones de escasez de nutrientes¹⁷², aumentando así su resistencia y persistencia en las paredes de los conductos radiculares instrumentados¹⁷³.

¹⁶⁹ Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. J Endod. 1985;11:525-528.

¹⁷⁰ Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004;30:315-20.

¹⁷¹ Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2008;41:873-82.

¹⁷² 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.

¹⁷³ Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod. 2002;28:689-93.

Discusión

En este trabajo, la formación de biopelículas se realizó en UVDs¹⁷⁴, lo que proporciona una adecuada estandarización, infección y manipulación de los especímenes. La viabilidad celular bacteriana se valoró mediante recuentos de UFCs y bioluminiscencia. Esta última fue determinada por la detección del ATP presente en las células viables.

Tradicionalmente las técnicas de cultivo se aplican para evaluar la eficacia antimicrobiana de las soluciones irrigadoras en endodoncia. En este sentido, la determinación de ATP¹⁷⁵ puede considerarse una alternativa adecuada durante el tratamiento de conductos radiculares. Permite de forma rápida, estimar la presencia y cantidad de bacterias viables, aunque no necesariamente con capacidad de crecer en un medio¹⁷⁶. El ensayo de bioluminiscencia tiene suficiente sensibilidad en la detección de bacterias (entre 10 y 100 células) y puede discriminar entre cultivos positivos y negativos. De hecho, en nuestros resultados, hemos obtenido una correlación positiva entre esta variable y las UFCs.

En este estudio seleccionamos EDTANa₄, como agente quelante, porque su pH alcalino permite mezclarlo con NaClO en una solución única. Está demostrado que dicha combinación no altera, a corto plazo, la capacidad de disolución de materia orgánica e inorgánica de sus

¹⁷⁴ Ruiz-Linares M, Aguado-Pérez B, Baca P, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM. Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. *Int Endod J*. 2017;50:77–83.

¹⁷⁵ Tan KS, Yu VS, Quah SY, Bergenholtz G. Rapid method for the detection of root canal bacteria in endodontic therapy. *J Endod*. 2015;41:447-50.

¹⁷⁶ Beumer RR, de Vries J, Rombouts FM. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int J Food Microbiol*. 1992;15:153-63.

respectivos componentes¹⁷⁷. Debido a su baja capacidad de quelación, el uso de EDTANa₄ no se ha recomendado tras el uso de NaClO para eliminar el barrillo dentinario. Sin embargo, mezclado con NaClO podría usarse durante toda la preparación biomecánica. De esta forma, su acción quelante débil pero continuada, permitiría la eliminación del barrillo dentinario sin que la estructura dentinaria se viera afectada¹⁷⁸.

Nuestros resultados muestran que la mayor eficacia antimicrobiana se obtuvo en los grupos donde NaClO estaba presente, en los cuales no hubo ningún crecimiento bacteriano (UFCs) y se obtuvieron los valores de bioluminiscencia más bajos. Los valores de ULRs en estos grupos, con valores de cultivos negativos, fueron iguales entre sí y estadísticamente inferiores a los grupos de EDTANa₄ al 10% y 20% y al grupo control.

La reducción microbiana obtenida por las soluciones de EDTANa₄ al 10% y 20% podría atribuirse a su pH y a una acción mecánica de arrastre. Aunque cabría esperar una mayor eficacia a mayor concentración, los resultados mostraron mayor porcentaje de reducción bacteriana con una concentración al 10% frente al 20%. Es conocido que no existen diferencias significativas en la eliminación del barrillo dentinario con diferentes concentraciones de EDTANa₄¹⁷⁹. No obstante, la exposición de músculo bovino a dichas soluciones aumenta la

¹⁷⁷ Tartari T, Oda DF, Zancan RF, da Silva TL, de Moraes IG, Duarte MA et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J.* 2017;50:106–114.

¹⁷⁸ De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J Jr et al. 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.

¹⁷⁹ O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC. A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *J Endod.* 2000;26:739-43.

deposición de iones sodio en su superficie e induce la hidratación de la muestra de una forma concentración-dependiente¹⁸⁰. En este sentido, la exposición a estas soluciones podría determinar una mayor hidratación de la superficie de la biopelícula y, por tanto, explicar la menor eficacia antibacteriana de una concentración del 20% respecto al 10%.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de soluciones mixtas de NaClO al 2,5% y EDTANa₄ a concentraciones del 5% y 10% ponen de manifiesto que la eficacia antiséptica del NaClO no se ve afectada por la combinación. Este hecho está relacionado con la baja reducción en el contenido de cloro libre disponible de NaClO por las soluciones de EDTANa₄ a corto plazo¹⁸¹. De igual forma, está demostrado que la desactivación y degradación del EDTA por NaClO es muy lenta y no pone en peligro su rendimiento clínico¹⁸².

Un estudio reciente muestra que los cambios en la composición de la dentina producidos por la combinación de NaClO al 2,5% y EDTANa₄ al 5% y 10% se producen en proporciones similares. Así, mientras que el EDTANa₄ desmineraliza la dentina, el NaClO desproteiniza el

¹⁸⁰ Tartari T, Oda DF, Zancan RF, da Silva TL, de Moraes IG, Duarte MA et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J*. 2017;50:106–114.

¹⁸¹ Tartari T, Oda DF, Zancan RF, da Silva TL, de Moraes IG, Duarte MA et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J* 2017; 50:106–114.

¹⁸² Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic reactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod*. 2012;38:426-31.

colágeno expuesto¹⁸³, lo que podría representar una ventaja añadida para su uso como solución única.

Por otra parte, se ha demostrado que la mayor descalcificación de la pared del conducto producida por otros agentes quelantes, tales como EDTA o BioPure MTAD (Dentsply/Tulsa, Tulsa, OK), da lugar a una menor fuerza de adhesión de los materiales de relleno a la dentina del conducto radicular¹⁸⁴. En este sentido, soluciones combinadas de NaClO y EDTANa₄ preservan la proporción natural de materia orgánica e inorgánica de la dentina¹⁸⁵, lo que favorecería una mejor infiltración del material en la dentina desmineralizada y podría proporcionar una mayor estabilidad de la unión a lo largo del tiempo^{186,187}.

Una forma de mejorar la actividad bactericida de las soluciones es incorporar detergentes, como agentes activos de superficie, para mejorar sus propiedades humectantes y antibacterianas¹⁸⁸. Así, la actividad antimicrobiana residual de soluciones de ácido maleico al 7%, EDTA al 17% y ácido láctico al 10% con CTR al 0,2%, frente a biopelículas de

¹⁸³ 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:e42-e54.

¹⁸⁴ De-Deus G, Namen F, Galan J Jr, Zehnder M. Soft chelating irrigation protocol optimizes bonding quality of Resilon/Epiphany root fillings. *J Endod*. 2008;34:703-5.

¹⁸⁵ 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:e42-e54.

¹⁸⁶ De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth t issue: methods and results. *J Dent Res*. 2005;84:118-32.

¹⁸⁷ De-Deus G, Namen F, Galan J Jr, Zehnder M. Soft chelating irrigation protocol optimizes bonding quality of Resilon/Epiphany root fillings. *J Endod*. 2008;34:703-5.

¹⁸⁸ Giardino L, Estrela C, Generali L, Mohammadi Z, Asgary S. The in vitro effect of Irrigants with Low Surface Tension on *Enterococcus faecalis*. *Iran Endod J*. 2015;10:174-8.

E. faecalis, fue mayor que el uso de estos agentes quelantes solos¹⁸⁹. Asimismo, el uso conjunto de soluciones oxidantes y quelantes, como Hypoclean y Tetraclean NA (Ogna Laboratori Farmaceutici, Muggio, Italy), que contienen CTR en su composición, mejoran la actividad antimicrobiana y la descontaminación intratubular en conductos radiculares infectados con *E. faecalis*¹⁹⁰.

En el presente trabajo, la adición de CTR al 0,2% a soluciones de NaClO al 2,5% + EDTANa₄ al 5% y 10% aumento las propiedades antimicrobianas de las soluciones, con valores más bajos de ULRs. Sin embargo, el número de células viables no se redujo significativamente. En este sentido, es posible que la disrupción de los exopolisacáridos de la matriz requiera un tiempo de acción más prolongado de las soluciones en las biopelículas o una mayor concentración de CTR en su composición. No obstante, CTR puede proporcionar a las soluciones otras ventajas como humectabilidad¹⁹¹, capacidad para alterar las biopelículas o acción antimicrobiana residual¹⁹².

Por otra parte, entre las limitaciones del uso de una solución combinada de NaClO y EDTANa₄ se encuentra la influencia del calor

¹⁸⁹ Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrime on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2012;38:826-8.

¹⁹⁰ Giardino L, Del Fabbro M, Cesario F, Fernandes FS, Andrade FB. Antimicrobial effectiveness of combinations of oxidant and chelating agents in infected dentine: an ex vivo confocal laser scanning microscopy study. Int Endod J. 2018;51:448-456.

¹⁹¹ Yilmaz Z, Basbag B, Buzoglu HD, Gümüşderelioglu M. Effect of low-surface-tension EDTA solutions on the wettability of root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;111:109-14.

¹⁹² Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. J Endod. 2013;39:1413-5.

en la cinética de la reacción. La actividad terapéutica se reduce a 20 minutos cuando la solución alcanza una temperatura intraconducto de 35 °C¹⁹³. Sin embargo, el tiempo de preparación de un conducto radicular normalmente es inferior a 20 minutos, lo que implicaría que, para que la solución combinada sea efectiva se debe preparar justo antes de su utilización. Además, podrían emplearse en un protocolo de irrigación alternado, usando tras cada cambio de lima una de estas soluciones, es decir, alternando el agente quelante con el NaClO. De esta forma, no habría pérdida alguna de las propiedades de cada una de las soluciones durante la preparación químico-mecánica.

Biocompatibilidad

La biocompatibilidad de los materiales de uso endodóntico es motivo de preocupación debido al contacto que puede producirse entre estos y el tejido conectivo periapical, lo que puede conllevar desde la alteración o retraso del proceso de curación hasta la degeneración de los tejidos circundantes¹⁹⁴.

Determinar la biocompatibilidad de las soluciones irrigadoras es un objetivo deseable para establecer su seguridad de uso. En este sentido, se aconseja realizar una variedad de pruebas que analicen distintos

¹⁹³ Wright PP, Kahler B, Walsh LJ. The Effect of Heating to Intracanal Temperature on the Stability of Sodium Hypochlorite Admixed with Etidronate or EDTA for Continuous Chelation. *J Endod.* 2019;45:57-61.

¹⁹⁴ Tepel J, Darwisch el Sawaf M, Hoppe W: Reaction of inflamed periapical tissue to intracanal medicaments and root canal sealers. *Endod Dent Traumatol* 1994;10:233-38.

parámetros¹⁹⁵, entre los que se encuentra la citotoxicidad (Organización Internacional de Estandarización, ISO 10993-5 2009)¹⁹⁶.

Los estudios *in vitro* son simples, no requieren alto coste y proporcionan una cantidad significativa de información, cuando se realizan bajo condiciones controladas¹⁹⁷. Además, los resultados obtenidos, aunque no pueden ser extrapolados de manera certera, podrían ser indicativos de los efectos inducidos *in vivo*.

En el presente trabajo se utilizó el ensayo MTT, introducido por Mosmann en 1980¹⁹⁸. Este método se utiliza como técnica estándar para la evaluación de la citotoxicidad de nuevos materiales. Evalúa la capacidad de las células viables para convertir sales de tetrazolio solubles en agua, en cristales de formazan insolubles, a través de la actividad de la enzima mitocondrial deshidrogenasa. Sus principales ventajas son la rapidez, exactitud de la técnica y reproducibilidad. Otra ventaja adicional es que no necesita un paso de lavado, lo que podría causar variaciones en la muestra.

Para la evaluación *in vitro* de la viabilidad celular de soluciones con acción bactericida se pueden realizar diluciones de las mismas, en

¹⁹⁵ Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res.* 1999;45:214-22.

¹⁹⁶ ISO: International Standard Organization. Geneva: ISO; [acceso 27 may 2020]. Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. Disponible en: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=36406/.

¹⁹⁷ Fina BL, Lombarte M, Rigalli A. Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico?. *Actual Osteol.* 2013;9:23-240.

¹⁹⁸ Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

solución fisiológica o en medio de cultivo, o utilizarlas sin diluir¹⁹⁹. En este estudio las soluciones irrigadoras se utilizaron sin diluir y a concentraciones de uso en la práctica clínica. Esto permite calcular el posible daño celular ocasionado por las soluciones en contacto directo con los tejidos periapicales, dado que la cantidad y concentración en la que pueden alcanzar la región apical es incierta²⁰⁰. Se utilizaron tiempos de 1 hora y 24 horas para evaluar la citotoxicidad a corto y medio plazo.

Diferentes estudios de citotoxicidad de soluciones de EDTA e NaClO muestran resultados coincidentes en cuanto a la mayor citotoxicidad del NaClO respecto a soluciones de EDTA, independientemente del método y población celular utilizados para su determinación^{201,202,203,204}. Ambas soluciones fueron citotóxicas de forma concentración y tiempo dependiente.

Marins *et al.* mostraron evidencia de citotoxicidad de soluciones de EDTA solo a las concentraciones más altas probadas (8,5% y 17%), a diferencia del NaClO que fue citotóxico en todas las concentraciones

¹⁹⁹ Ryu M, Matsumura R, Quan G, Furuta T. Comparison of the cytotoxicity of high-level disinfectants by the MTT assay and direct contact assay. *Biocontrol Sci.* 2013;18:221-5.

²⁰⁰ Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J.* 2010;43:430-5.

²⁰¹ Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris AH. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *J Endod.* 1999;25:21-3.

²⁰² Marins JS, Sassone LM, Fidel SR, Ribeiro DA. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Braz Dent J.* 2012;23:527-33.

²⁰³ Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2016;49:764-73.

²⁰⁴ Botton G, Pires CW, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IB et al. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *Int Endod J.* 2016;49:746-54.

Discusión

ensayadas (1,25%, 2,5% y 5,25%)²⁰⁵. Resultados que concuerdan con los obtenidos por Vouzara *et al.* con diferentes diluciones de ambas soluciones en tiempos de 6 y 24 horas²⁰⁶. En dicho trabajo soluciones combinadas de NaClO con EDTA fueron menos citotóxicas que las soluciones probadas individualmente.

Los resultados del presente estudio muestran mayor citotoxicidad, tras una hora de contacto, de una solución de NaClO al 2,5% (viabilidad celular del 27%) respecto a soluciones de EDTANa₄ al 10% y 20% (porcentaje de viabilidad del 60% y 73%, respectivamente). Estudios recientes de citotoxicidad en fibroblastos humanos para una solución de NaClO al 5,25%, obtienen porcentajes de viabilidad celular del 22%, en un tiempo de exposición de 15 minutos²⁰⁷, y del 30% aproximadamente en un tiempo de 4 horas²⁰⁸.

En este estudio, las soluciones combinadas de EDTANa₄ con NaClO fueron menos citotóxicas que NaClO al 2,5%. Se sabe que el potencial cáustico de las soluciones de hipoclorito se ve afectado por el cloro disponible más que por el pH o la osmolaridad²⁰⁹. La mezcla de soluciones de EDTA con NaClO causa una reducción en el contenido de

²⁰⁵ Marins JS, Sassone LM, Fidel SR, Ribeiro DA. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Braz Dent J.* 2012;23:527-33.

²⁰⁶ Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2016;49:764-73.

²⁰⁷ Karkehabadi H, Yousefifakhr H, Zadsirjan S. Cytotoxicity of Endodontic Irrigants on Human Periodontal Ligament Cells. *Iran Endod J.* 2018;13:390-394.

²⁰⁸ Uğur Aydın Z, Akpınar KE, Hepokur C, Erdönmez D. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Braz Oral Res.* 2018;32:e119.

²⁰⁹ 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.

cloro libre disponible²¹⁰. Dicha pérdida sería responsable de la menor toxicidad mostrada por las soluciones combinadas de NaOCl con EDTANa₄.

El menor porcentaje de viabilidad fue para una solución de NaClO al 2,5% + EDTANa₄ al 5% (40,39%) con diferencias respecto a los demás grupos de soluciones combinadas, las cuales mostraron un porcentaje de viabilidad celular mayor (55-70%), sin diferencias estadísticamente significativas, entre ellas.

Tartari *et al.* demostraron que soluciones de EDTANa₄ al 10% y 20% combinadas con NaClO al 5% reducen el cloro libre disponible al 62% y 49%, respectivamente²¹¹. En este sentido, la menor viabilidad celular mostrada por la solución NaClO 2,5% + EDTANa₄ 5% podría atribuirse a la mayor cantidad de cloro libre disponible en dicha combinación.

La mayor viabilidad obtenida por una solución de EDTANa₄ al 20%, tanto sola como combinada con NaClO, respecto a la solución de EDTANa₄ al 10% podría estar relacionada con la cantidad de iones sodio presentes en el agente quelante. Se ha mostrado que la exposición de muestras orgánicas, como músculo bovino²¹² o

²¹⁰ Tartari T, Oda DF, Zancan RF, da Silva TL, de Moraes IG, Duarte MA et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J.* 2017;50:106-114.

²¹¹ Tartari T, Oda DF, Zancan RF, da Silva TL, de Moraes IG, Duarte MA et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J.* 2017;50:106-114.

²¹² Tartari T, Oda DF, Zancan RF, da Silva TL, de Moraes IG, Duarte MA et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J.* 2017;50:106-114.

biopelículas de *E. faecalis*²¹³, a estas soluciones favorece su hidratación por la deposición en superficie de iones sodio de una forma concentración dependiente. La mayor hidratación de las muestras, a mayor concentración del agente quelante, podría ser responsable de la menor toxicidad encontrada para una concentración de EDTANa₄ al 20%.

Los resultados de citotoxicidad tras 24 horas de exposición a las soluciones muestran una reducción del porcentaje de viabilidad celular, en la mayoría de los grupos de estudio. Creemos que este efecto puede explicarse por la falta de nutrientes, dado que las soluciones no se prepararon en medio de cultivo. Por esta razón, todos los grupos de estudio, excepto el grupo de NaOCl al 2,5%, mostraron una viabilidad similar, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

La solución de NaOCl al 2,5% también redujo la viabilidad con el tiempo (del 27,75% al 20,97%), aunque en este caso el efecto puede atribuirse a su acción citotóxica potente y directa. Botton *et al.* estudiaron la citotoxicidad a largo plazo (24 y 72 horas) de soluciones de NaClO al 1% y 2,5%, EDTA al 17%, solas y combinadas, sobre células mononucleares humanas de sangre periférica²¹⁴. La reducción de la viabilidad celular fue mayor y mantenida en ambos periodos de tiempo para soluciones de NaClO al 1% y 2,5%. La combinación de ambas concentraciones de NaClO con EDTA al 17% obtuvo mayores porcentajes de viabilidad. Estos resultados están en consonancia, a

²¹³ Solana C, Ruiz-Linares M, Baca P, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM. Antibiofilm Activity of Sodium Hypochlorite and Alkaline Tetrasodium EDTA Solutions. *J Endod.* 2017;43:2093-2096.

²¹⁴ Botton G, Pires CW, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IB et al. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *Int Endod J.* 2016;49:746-54.

pesar de las diferencias metodológicas, con los obtenidos a las 24 horas en este trabajo para una solución de NaClO al 2,5% y soluciones combinadas de NaClO + EDTANa₄.

Un estudio reciente, en fibroblastos periodontales humanos, compara la citotoxicidad de una solución de NaClO al 5,25% con soluciones de quitosan y propolis²¹⁵. Los resultados a las 24 horas para una solución de NaClO muestran un porcentaje de viabilidad aproximadamente del 20%.

Por otra parte, la incorporación de CTR a las soluciones de EDTANa₄ + NaClO mostró una tendencia a mejorar la viabilidad celular en ambos tiempos de estudio. Se sabe que la adición de tensioactivos a las preparaciones de NaClO acelera la degradación del cloro libre disponible²¹⁶ probablemente debido a la reacción entre NaClO y los tensioactivos que son compuestos orgánicos²¹⁷.

La citotoxicidad de los irrigantes del conducto radicular es importante debido a su contacto cercano con tejidos del organismo. El uso de nuevas soluciones irrigadoras para la preparación del conducto radicular exige probar sus posibles efectos indeseables como requisito previo a su recomendación. Aunque los resultados obtenidos en esta investigación no pueden extrapolarse al contexto clínico, se podría esperar una reducción de la citotoxicidad de las soluciones debido a su dilución por los tejidos periapicales. En este sentido, se necesitan

²¹⁵ Uğur Aydın Z, Akpınar KE, Hepokur C, Erdönmez D. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Braz Oral Res.* 2018;32:e119.

²¹⁶ Guastalli AR, Clarkson RM, Rossi-Fedele G. The Effect of Surfactants on the Stability of Sodium Hypochlorite Preparations. *J Endod.* 2015;41:1344-1348.

²¹⁷ Rutala WA, Cole EC, Thomann CA, Weber DJ. Stability and bactericidal activity of chlorine solutions. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:323-327.

Discusión

futuros estudios para evaluar los resultados sobre la respuesta inflamatoria del huésped.

Según los resultados de este trabajo, y teniendo en cuenta que se trata de un estudio *in vitro*, soluciones combinadas de NaClO y EDTANa₄ constituyen una alternativa a la técnica de irrigación convencional. Igualmente, su uso en un régimen de irrigación alternado tiene como ventaja la mayor eficacia de la solución de NaClO, sin la limitación de pérdida de cloro libre disponible en el tiempo, dado que no se produce interacción entre las soluciones.

Conclusiones

1. La actividad antimicrobiana de soluciones alcalinas de EDTANa₄ al 10% y 20% frente a biopelículas de *E. faecalis* es similar entre ambas, e inferior a la obtenida por una solución de NaClO al 2,5%.
2. La combinación de soluciones de EDTANa₄ con NaClO, con o sin la adición de CTR al 0,2%, mostró una actividad antibiopelícula similar a la de una solución de NaClO al 2,5%.
3. La citotoxicidad de soluciones de EDTANa₄, solas y combinadas con NaClO, con y sin la adición de CTR, fue menor que la obtenida por una solución de NaOCl al 2,5%.

Bibliografía

AAE: American Association of Endodontists. Chicago: AAE; [acceso 27 may 2020]. Glossary of Endodontic Terms Disponible en: <http://www.aae.org/clinical-resources/aae-glossary-of-endodontic-terms.aspx>

Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J Endod.* 2010;36:847–850.

Al-Nazhan S, SpHngberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endod.* 1990;16:129-34.

Alves FR, Andrade-Junior CV, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Rôças IN, Versiani MA et al. Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro-Computed Tomography, and Cryopulverization Approach. *J Endod.* 2016;42:1667-1672.

Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *Int Endod J.* 2007;40:338-43.

Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, Wittmer A, Schmid M, Karygianni L et al. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. *PLoS One.* 2012;7:e49576.

Bibliografía

Antunes H.S, Rocas I.N, Alves F.R, Siqueira J.F Jr. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. *J Endod.* 2015;41:1037–1042.

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

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Rodríguez E, Liébana-Ureña J, Espigares-García M. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:e84-9.

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

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.

Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Garcia EG, Duarte MAH et al. Antimicrobial activity of chlorhexidine, peracetic acid and sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J.* 2015;48:1188-1193.

Ates M, Akdeniz BG, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:626-30.

Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J.* 2007;52:S64-S82.

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

Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on enterococcus faecalis biofilm in dentin. *J Endod.* 2011;37:363-366.

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

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

Bajrami D, Hoxha V, Gorduysus O, Muftuoglu S, Zeybek ND, Küçükkaya S. Cytotoxic effect of endodontic irrigants in vitro. *Med Sci Monit Basic Res.* 2014;20:22-6.

Baker RW. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins: 1. Physico-chemical study of the course of the reaction. *Biochem J.* 1947;41:337-342.

Bibliografía

Ballal NV, Das S, Rao BSS, Zehnder M, Mohn D. Chemical, cytotoxic and genotoxic analysis of etidronate in sodium hypochlorite solution. *Int Endod J.* 2019;52:1228-1234.

Ballal NV, Gandhi P, Shenoy PA, Belle VS, Bhat V, Rechenberg DK et al. Safety assessment of an etidronate in a sodium hypochlorite solution: randomized double-blind trial. *Int Endod J.* 2019;52:1274-1282.

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;35:1573–1576.

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

Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endodontic Topics.* 2012;27:74-102.

Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:240-245.

Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod.* 2007;33:966–969.

Beumer RR, de Vries J, Rombouts FM. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int J Food Microbiol.* 1992;15:153-63.

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.

Botton G, Pires CW, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IB et al. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *Int Endod J.* 2016;49:746-54.

Boutsioukis C, Psimma Z, Kastrinakis E. The effect of flow rate and agitation technique on irrigant extrusion ex vivo. *Int Endod J.* 2014;47:487-96.

Calt S, Serper A. Time-dependent effects of edta on dentin structures. *J Endod.* 2002;28:17-19.

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.

Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazonni A et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater.* 2010;26:779-85.

Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod.* 2005;31:471-3.

Chhabra R, Huff J, Haseman J, Elwell M, Peters A. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol.* 1991;29:119-124.

Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2008;41:873-82.

Bibliografía

Clewell DB, Weaver KE. Sex-pheromones and plasmid transfer in enterococcus-faecalis. *Plasmid*. 1989;21:175-184.

De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth t issue: methods and results. *J Dent Res*. 2005;84:118-32.

De-Deus G, Namen F, Galan J Jr, Zehnder M. Soft chelating irrigation protocol optimizes bonding quality of Resilon/Epiphany root fillings. *J Endod*. 2008;34:703-5.

De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J Jr et al. 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.

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

Dynes JJ, Lawrence JR, Korber DR, Swerhone GDW, Leppard GG, Hithcock AP. Speciation and Quantitative mapping of chlorhexidine in natural river biofilms. *Sci Total Environ*. 2006;369:369-383.

Ehrenfeld E, Kessler R, Clewell D. Identification of Pheromone-Induced Surface Proteins in *Streptococcus faecalis* and Evidence of a Role for Lipoteichoic Acid in Formation of Mating Aggregates. *J Bacteriol*. 1986;168:6-12.

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.

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FGR, Nascimento GG, Carvalho CAT, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod.* 2015;41:824-830.

Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruíz-Linares M, Martínez García ME, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *Int J Oral Sci.* 2014;6:46-9.

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;47:380-6.

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

Ferrer-Luque CM, González-Castillo S, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT, Rodríguez-Archilla A, Baca P et al. Antimicrobial residual effects of irrigation regimens with maleic acid in infected root canals. *J Biol Res.* 2015;22:1.

Ferrer-Luque CM, Perez-Heredia M, Baca P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP. Decalcifying effects of antimicrobial irrigating solutions on root canal dentin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18:e158-e161.

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

Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of enterococcus faecalis in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:234-239.

Fina BL, Lombarte M, Rigalli A. Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico?. *Actual Osteol.* 2013;9:23-240.

Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14:563-75.

Galler K, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerinnk JD, Hecker S et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod* 2011;37:1536-41.

Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M et al. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod.* 2015;41:363-368.

Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod.* 2011;37:1536-1541.

Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Hoffer PC et al. Edta conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2016;49:581-590.

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.

Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod.* 2006;32:1091-1093.

Giardino L, Del Fabbro M, Cesario F, Fernandes FS, Andrade FB. Antimicrobial effectiveness of combinations of oxidant and chelating agents in infected dentine: an ex vivo confocal laser scanning microscopy study. *Int Endod J.* 2018;51:448-456.

Giardino L, Estrela C, Generali L, Mohammadi Z, Asgary S. The in vitro effect of Irrigants with Low Surface Tension on *Enterococcus faecalis*. *Iran Endod J.* 2015;10:174-8.

Girard S, Paque´ F, Badertscher M, Sener B, Zehnder M. Assessment of a gel-type chelating preparation containing 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate. *Int Endod J.* 2005;38:810–816.

Gomes B, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003;36:267-275.

Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediaminetetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J.* 2003;36:411–415.

Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine - an adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986;57:370-377.

Bibliografía

Guastalli AR, Clarkson RM, Rossi-Fedele G The Effect of Surfactants on the Stability of Sodium Hypochlorite Preparations. *J Endod.* 2015;41:1344-1348.

Haapasalo M, Qian W, Shen Y. Irrigation: Beyond the smear layer. *Endodontic Topics.* 2012;27:35-53.

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

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

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 2014;216:299-303.

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

Hart JR. Ethylenediaminetetraacetic acid and related chelating agents. En: Hart JR. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol 13. 7a ed. Wiley-VCH: Weinheim; 2012. p. 573–578.

Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: A review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003.36:75-85.

Hubble T, Hatton J, Nallapareddy S, Murray B, Gillespie M. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:121-126.

Hynes W, Walton S. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;183:201-207.

ISO: International Standard Organization. Geneva: ISO; [acceso 27 may 2020]. Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. Disponible en: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=36406/.

Jennings MC, Minbiole KPC, Wuest WM. Quaternary ammonium compounds: An antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance. *Acs Infect Dis.* 2015;1:288-303.

Jett B, Jensen H, Nordquist R, Gilmore M. Contribution of the pAD1-Encoded Cytolysin to the Severity of Experimental *Enterococcus faecalis* Endophthalmitis. *Infect Immun.* 1992;60:2445-52.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of Enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7:462-478.

Karkehabadi H, Yousefifakhr H, Zadsirjan S. Cytotoxicity of Endodontic Irrigants on Human Periodontal Ligament Cells. *Iran Endod J.* 2018;13:390-394.

Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:308-320.

Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J.* 2006;32:112-115.

Bibliografía

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

Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris AH. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *J Endod.* 1999;25:21-3.

Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *enterococcus-faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun.* 1992;60:25-30.

Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J.* 2010;43:430-5.

Leow N, Abbott P, Castro Salgado J, Firth L. Evaluation of smear layer removal by bicarbonate soda, ethylenediamine tetraacetic acid with cetrimide and sodium hypochlorite with a new model. *Aust Endod J.* 2012;38:107-12.

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.

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

Macedo RG, Verhaagen B, Wesselink PR, Versluis M, van der Sluis LW. Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on

the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int Endod J.* 2014;47:147–154.

Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod.* 2005;31:746-8.

Marins JS, Sassone LM, Fidel SR, Ribeiro DA. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Braz Dent J.* 2012;23:527-33.

McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod.* 1975;1:238–242.

Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:295–298.

Merianos JJ. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. En: Block SS. *Disinfection, Sterilization, and Preservation.* 4a ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 225–62.

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

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.

Bibliografía

Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J Endod.* 2009;35:1023–1027.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

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

Nakamura VC, Cai S, Candeiro GT, Ferrari PH, Caldeira CL, Gavini G. Ex vivo evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. *Int Endod J.* 2013;46:217-24.

Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun.* 2000;68:5218-5224.

Navarro-Escobar E, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15:e90-4.

Neelakantan P, Subbarao C, Subbarao CV, De-Deus G, Zehnder M. The impact of root dentine conditioning on sealing ability and push-out bond strength of an epoxy resin root canal sealer. *Int Endod J.* 2011;44:491–8.

Neelakantan P, Varughese AA, Sharma S, Subbarao CV, Zehnder M, De Deus G. Continuous chelation irrigation improves the adhesion of epoxy resin-based root canal sealer to root dentine. *Int Endod J*. 2012;45:1097–102.

O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC. A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *J Endod*. 2000;26:739-43.

Orhan EO, Irmak Ö, Hür D, Yaman BC, Karabucak B. Does para-chloroaniline really form after mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine?. *J Endod*. 2016;42:455–459.

Pang N-S, Lee SJ, Kim E, Shin DM, Cho SW, Park W et al. Effect of edta on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*. 2014;40:811-817.

Pappen FG, Souza EM, Giardino L, Carlos IZ, Leonardo MR, de Toledo Leonardo R. Endodontic chelators induce nitric oxide expression by murine-cultured macrophages. *J Endod*. 2009;35:824-8.

Paqué F, Al-Jadaa A, Kfir A. Hard-tissue debris accumulation created by conventional rotary versus self-adjusting file instrumentation in mesial root canal systems of mandibular molars. *Int Endod J*. 2012;45:413-8.

Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppim-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. *J Dent*. 2009;37:903–908.

Bibliografía

Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod.* 1985;11:525-8.

Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J.* 2008;41:418-23.

Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *J Endod.* 2006;32:993-7.

Pertot WJ, SindresV, SzekeresG, Proust JP. Model for quantitative Immunohisto-chemical assessment of pulpal response to biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 1997;15:457-62.

Peters OA. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J.* 2013;46:195-7.

Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. *Endodontic Topics.* 2003;6:135-159.

Prado M, Gusman H, Gomes BP, Simão RA. Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. *J Endod.* 2011;37:255–258..

Prado M, Santos Júnior HM, Rezende CM, Pinto AC, Faria RB, Simao RA et al. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *J Endod.* 2013;39:505–510.

Prado M, Silva EJ, Duque TM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. *J Appl Oral Sci.* 2015;23:158-63.

Qian W, Shen Y, Haapasalo M. Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *J Endod.* 2011;37:1437-1441.

RAE: Real Academia Española: Diccionario de la lengua española. España: RAE; [Acceso 27 may 2020] Disponible en: <https://dle.rae.es>

Rappaport HM, Lilliy GE, Kapsimalis P. Toxicity of endodontic filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1964;18:785-802.

Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod.* 2008;34:1521–1523.

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

Rodríguez-Martínez JB, González-Rodríguez MP, González-López S, Ferrer-Luque CM. Influence of adhesive systems on microtensile bond strength of resin-based endodontic sealers to the root dentin. *J Clin Exp Dent.* 2014;6:e203-8.

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

Bibliografía

Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic reactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod.* 2012;38:426-31.

Ruiz-Linares M, Aguado-Pérez B, Baca P, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM. Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. *Int Endod J.* 2017;50:77-83.

Rutala WA, Cole EC, Thomann CA, Weber DJ. Stability and bactericidal activity of chlorine solutions. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:323-327. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J.* 2005;38:735-42.

Ryan S. Chlorhexidine as a canal irrigant: A review. *Compend Contin Educ Dent.* 2010;31:338-364.

Ryu M, Matsumura R, Quan G, Furuta T. Comparison of the cytotoxicity of high-level disinfectants by the MTT assay and direct contact assay. *Biocontrol Sci.* 2013;18:221-5.

Scelza MF, Antoniazzi JH, Scelza P. Efficacy of final irrigation - a scanning electron microscopic evaluation. *J Endod.* 2000;26:355-8.

Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages: Endodontic implications. *J Endod.* 1997;23:205-208.

Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez A, Llamas R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive

intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. *J Endod.* 1996;22:337-340.

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

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

Siqueira JF, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics.* 2000;26:331-334.

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

Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod.* 2005;31:669-671.

Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonça RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Júnior M et al. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2010;36:894–898.

Bibliografía

Solana C, Ruiz-Linares M, Baca P, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM. Antibiofilm Activity of Sodium Hypochlorite and Alkaline Tetrasodium EDTA Solutions. *J Endod.* 2017;43:2093-2096.

Sousa SM, Bramante CM, Taga EM. Biocompatibility of EDTA, EGTA and citric acid. *Braz Dent J.* 2005;16:3-8.

Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in-vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1973;36:856-871.

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.

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.

Tan KS, Yu VS, Quah SY, Bergenholtz G. Rapid method for the detection of root canal bacteria in endodontic therapy. *J Endod.* 2015;41:447-50.

Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res.* 1999;45:214-22.

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:e42-e54.

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.

Tartari T, Oda DF, Zancan RF, Da Silva TL, De Moraes IG, Duarte MAH et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J.* 2017;50:106–114.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod.* 2014;40:670-677.

Tepel J, Darwisch el Sawaf M, Hoppe W: Reaction of inflamed periapical tissue to intracanal medicaments and root canal sealers. *Endod Dent Traumatol* 1994;10:233–38.

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M et al. The enterococcal surface protein, esp, is involved in enterococcus faecalis biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:4538-45.

Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK, Linda L. Clinical implications of the smear layer in endodontics: A review. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:658-66.

Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod.* 2011;37:1109–1115.

Uğur Aydın Z, Akpınar KE, Hepokur C, Erdönmez D. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Braz Oral Res.* 2018;32:e119.

Vilanova WV, Carvalho-Junior JR, Alfredo E, Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YT. Effect of intracanal irrigants on the bond strength of epoxy resin-based and methacrylate resin-based sealers to root canal walls. *Int Endod J.* 2012;45:42–8.

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

Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J.* 2002;35:791–795.

Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2016;49:764–773.

Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu C, Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod.* 2012;38:954-9.

Wang Z, Maezono H, Shen Y, Haapasalo M. Evaluation of root canal dentin erosion after different irrigation methods using energy-dispersive x-ray spectroscopy. *J Endod.* 2016;42:1834-1839.

Wright PP, Kahler B, Walsh LJ. The Effect of Heating to Intracanal Temperature on the Stability of Sodium Hypochlorite Admixed with Etidronate or EDTA for Continuous Chelation. *J Endod.* 2019;45:57-61.

Yilmaz Z, Basbag B, Buzoglu HD, Gümüsderelioglu M. Effect of low-surface-tension EDTA solutions on the wettability of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;111:109-14.

Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical-evaluation of the efficacy of edta solution as an endodontic irrigant. *Journal of Endodontics.* 1995;21:592-593.

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;94:756-762.

Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod.* 2005;31:817-820.

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

Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, Chebroly HP, Alzebdeh D, Badi MA et al. Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics. *J Endod.* 2016;42:1760-1766.

Anexos

