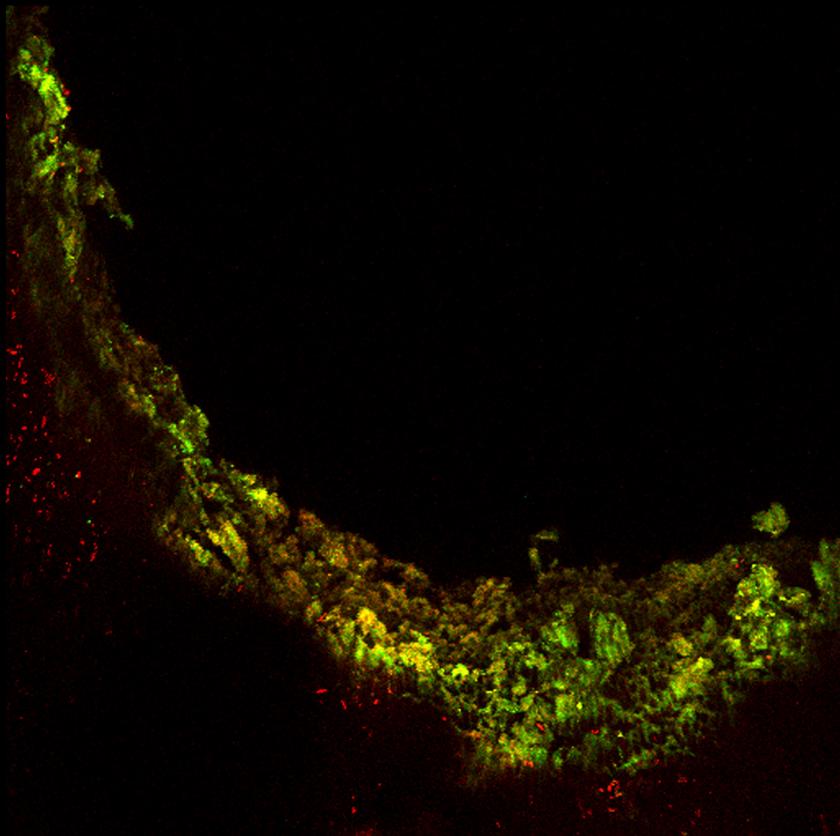


# Eliminación de biopelículas de *Enterococcus faecalis* de istmos dentales

Removal of *Enterococcus faecalis* biofilms  
from dental isthmuses



PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA  
TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

---

**NATALI FERNANDA VILLALTA BRIONES**



GRANADA, OCTUBRE DE 2021

UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
Departamento de Microbiología



**ELIMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*  
DE ISTMOS DENTALES**

***Removal of Enterococcus faecalis biofilms from dental  
isthmuses***

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

**NATALI FERNANDA VILLALTA BRIONES**

Granada, 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Natali Fernanda Villalta Briones  
ISBN: 978-84-1117-200-4  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72324>



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada durante los años 2017-2021, dentro del Grupo de Investigación “Microbiología, Inmunología, Epidemiología y Prevención de las Enfermedades Bucodentales” CTS 167.

Durante el desarrollo de este trabajo, la doctoranda ha realizado una estancia doctoral en el curso académico 2020/2021. La estancia de 3 meses de duración, se realizó en los laboratorios de investigación del Departamento de Microbiología Oral e Inmunología la Facultad de Odontología (*Institute of Odontology*) de la Universidad de Gotemburgo (Gotemburgo, Suecia). El trabajo realizado perteneció al tema de investigación “Interacción de neutrófilos con bacterias anaerobias”, bajo la supervisión del Profesor Johan Bylund.



## **AGRADECIMIENTOS**



Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mi directora de tesis, la Dra. Teresa Arias Moliz, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua del mismo, pero sobre todo por la motivación, la paciencia y el apoyo recibido a lo largo de estos años. También quiero agradecer a mi directora de tesis la Dra. Matilde Ruiz Linares, por su tiempo, su disponibilidad y orientación.

Al personal técnico de laboratorio, que con su trabajo han ayudado a que esta investigación haya terminado con éxito. Quiero agradecer en especial a Francisca Castillo Pérez y Yudi Gómez Villaescusa, con las que he compartido muchas horas y siempre han estado dispuestas a ayudarme y colaborar en lo que hiciera falta, además de brindarme su amistad y cariño. A la Dra. Carmen María Ferrer Luque y la Dra. Pilar Baca García por su ayuda y colaboración. También quiero agradecer a Ana Santos Carro por su asesoramiento y ayuda técnica con el microscopio.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos, en especial la ayuda y apoyo recibidos por parte de mi esposo, Aleix Navarro Sellés, y de mi amiga, Andrea Muñoz, quienes a pesar de las dificultades y la distancia han sabido ser mi soporte en este proceso.

Finalmente quiero agradecer a mi madre, la señora Ligia Briones, y a mi abuela, la señora Luz Torres, por haberme inculcado desde pequeña que con trabajo, esfuerzo y constancia lo imposible se transforma en posible.

A todos ellos, muchas gracias.



# ÍNDICE

---



|   |    |
|---|----|
| <b>Resumen</b> .....  | 1  |
| <b>Abstract</b> .....   | 5  |
| <b>1. Introducción</b> .....  | 9  |
| 1.1. Anatomía de los istmos dentales.....   | 9  |
| 1.2. Infección endodóntica.....   | 11 |
| 1.2.1. Patogenia de la infección endodóntica.....   | 11 |
| 1.2.2. Biopelículas microbianas.....  | 13 |
| 1.3. <i>Enterococcus</i> como patógeno en infecciones endodónticas.....   | 15 |
| 1.3.1. Características microbiológicas del género <i>Enterococcus</i> .....   | 15 |
| 1.3.2. <i>Enterococcus</i> en infecciones endodónticas.....   | 15 |
| 1.4. Tratamiento endodóntico.....   | 17 |
| 1.4.1. Barrillo dentinario.....   | 18 |
| 1.5. Soluciones irrigadoras.....  | 19 |
| 1.5.1. Hipoclorito de sodio.....  | 20 |
| 1.5.2. Ácido etidróico.....   | 21 |
| 1.6. Activación de las soluciones irrigadoras.....  | 22 |
| 1.6.1. Irrigación convencional con jeringa y aguja.....   | 23 |
| 1.6.2. Irrigación ultrasónica pasiva (IUP).....   | 24 |
| Métodos de aplicación de irrigación durante IUP.....  | 26 |
| 1.6.3. Irrigación activada con lima XP-endo Finisher.....   | 26 |
| <b>2. Hipótesis y Objetivos</b> .....   | 31 |
| <b>3. Materiales y Métodos</b> .....  | 35 |
| 3.1. Obtención de la raíces mesiales y soluciones irrigadoras.....  | 35 |
| 3.2. Preparación de los conductos radiculares.....  | 36 |
| 3.3. Infección de los conductos radiculares.....  | 38 |
| 3.4. Evaluación de la capacidad de las soluciones para eliminar biopelículas de <i>Enterococcus faecalis</i> crecidas en el interior de los conductos radiculares e istmos..... | 39 |
| Grupo irrigación convencional.....  | 40 |
| Grupo de activación ultrasónica.....  | 40 |
| Grupo XP-endo Finisher.....   | 40 |
| 3.5. Análisis estadístico.....  | 42 |
| <b>4. Resultados</b> .....  | 47 |
| <b>5. Discusión</b> .....   | 55 |

|  |    |
|--|----|
| 5.1. Justificación metodológica.....   | 55 |
| 5.2. Estudio de la desinfección de conductos radiculares e istmos mediante diferentes<br>protocolos de irrigación..... | 58 |
| <b>Conclusiones</b> .....  | 65 |
| <b>Conclusions</b> .....   | 69 |
| <b>Bibliografía</b> .....  | 73 |
| <b>Anexos</b> .....  | 93 |
| 1. Publicaciones .....   | 93 |
| 2. Indicios de calidad de las publicaciones/journal citation report (JCR).....   | 95 |

## **RESUMEN**

---



**Introducción:**

El éxito del tratamiento endodóntico depende de la eliminación de las biopelículas microbianas del sistema de conductos radiculares mediante procedimientos químico-mecánicos (irrigación/instrumentación). La compleja anatomía del sistema de conductos dificulta la acción de los instrumentos por lo que la irrigación juega un papel fundamental en la limpieza y desinfección de las zonas no tocadas por los instrumentos.

Los objetivos de esta tesis fueron 1) determinar la actividad antimicrobiana de la mezcla de hipoclorito de sodio y ácido etidróico utilizando diferentes métodos de irrigación que incluyen irrigación convencional, activación ultrasónica y activación con la lima XP-endo Finisher, durante la preparación químico-mecánica, frente a biopelículas microbianas crecidas en conductos radiculares e istmos y 2) comprobar si hay diferencias en la actividad antibiopelícula utilizando los diferentes métodos de irrigación, en los tercios coronal, medio y apical.

**Metodología:**

Para llevar a cabo los objetivos se seleccionaron 56 raíces mesiales de molares mandibulares, 28 con un istmo continuo desde el tercio cervical hasta el apical entre los dos conductos radiculares (tipo 1), y 28 con un istmo continuo desde el tercio cervical hasta el tercio medio y un conducto en el tercio apical (tipo 2). Los conductos radiculares se contaminaron durante 7 días con una suspensión de *Enterococcus faecalis*. En este estudio se incluyeron tres grupos experimentales y un grupo control ( $n = 7$  por tipo de anatomía del conducto radicular). Todos los conductos radiculares, excepto el grupo control que no fue tratado, se prepararon químico-mecánicamente y se asignaron a uno de los grupos experimentales según el método de irrigación final: irrigación convencional, activación ultrasónica o activación con la lima XP-endo Finisher. La solución de irrigación utilizada fue una combinación de hipoclorito de sodio al 2,5% y ácido etidróico al 9% y los protocolos finales se aplicaron durante tres ciclos de 30 segundos con un volumen de 3 ml. La actividad antimicrobiana se evaluó en cada localización (conducto radicular e istmo) y en cada tercio (cervical, medio y apical) mediante microscopía láser confocal previa tinción de las muestras con los fluorocromos Syto-9 y yoduro de propidio. Los parámetros evaluados fueron el biovolumen total y el porcentaje de población roja (células muertas). El análisis estadístico se realizó mediante SPSS (estadística descriptiva), SUDAAN (cálculos de los valores de  $p$ ) y DESCRIPT en SUDAAN para las comparaciones pareadas.

**Resultados:**

El biovolumen de los conductos radiculares se redujo significativamente con respecto al control en todos los grupos experimentales en todos los tercios, excepto en el caso de la irrigación convencional en el tercio apical ( $p > 0,05$ ). En los tercios cervical y medio, la activación ultrasónica se asoció con los biovolúmenes más bajos ( $p < 0,05$ ), seguida de XP-endo Finisher. En el istmo, la desinfección fue similar en todos los tercios para todos los protocolos. La irrigación convencional mostró valores intermedios sin diferencias significativas con el grupo de control ni con los protocolos activados ( $p > 0,05$ ), aunque estos últimos fueron significativamente diferentes del grupo control ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias entre la activación ultrasónica y XP-endo Finisher en los tercios medio y apical ( $p > 0,05$ ) en los istmos.

**Conclusiones:**

En los conductos radiculares, la activación ultrasónica y con la lima XP-endo Finisher de la solución combinada de NaClO y HEDP mostró una mayor eficacia que la irrigación convencional. En los istmos, no se observaron diferencias entre los dos métodos de activación y la irrigación convencional.

En relación a los tercios, el tercio apical de los conductos radiculares fue el más difícil de desinfectar en comparación con los otros tercios, siendo la irrigación convencional con la solución combinada de NaClO y HEDP el método menos efectivo. En los istmos, ninguno de los métodos de activación consiguió reducir las biopelículas microbianas en los tres tercios.

**Palabras clave:** irrigación convencional, istmo, molar mandibular, irrigación del conducto radicular, activación ultrasónica, XP-endo Finisher.

## **ABSTRACT**



**Introduction:**

The success of endodontic treatment depends on the removal of microbial biofilms from the root canal system by means of chemical-mechanical procedures (irrigation/instrumentation). The complex anatomy of the canal system makes the action of instruments difficult, so irrigation plays a fundamental role in the cleaning and disinfection of areas not touched by instruments.

The objectives of this thesis were 1) to determine the antimicrobial activity of the mixture of sodium hypochlorite and etidronic acid using different irrigation methods including conventional irrigation, ultrasonic activation and activation with the XP-endo Finisher file, during chemical-mechanical preparation, against microbial biofilms grown in root canals and isthmus and 2) to check whether there are differences in antibiofilm activity using the different irrigation methods, in the coronal, middle and apical thirds.

**Methodology:**

Fifty-six mesial roots of mandibular molars, 28 with a continuous isthmus from the cervical to the apical third between the two root canals (type 1), and 28 with a continuous isthmus from the cervical to the middle third and one canal in the apical third (type 2) were included. The root canals were contaminated for 7 days with an *Enterococcus faecalis* suspension. There were three experimental groups plus a control group ( $n = 7$  per type of root canal anatomy). All the root canals, except for the control group that was not treated, were chemomechanically prepared and then assigned to one of the experimental groups according to the final adjunctive procedure: conventional irrigation, ultrasonic activation or XP-endo Finisher activation. The irrigating solution used was a combination of 2.5% sodium hypochlorite and 9% etidronic acid, and the final protocols were applied for three cycles of 30 seconds with a 3 mL volume. The antibiofilm activity was evaluated at each location (root canal and isthmus) and third (cervical, middle and apical) using confocal laser scanning microscopy and the live/dead technique. The parameters assessed in each group were the total biovolume and the percentage of red population (dead cells). Statistical analysis was performed using SPSS (descriptive statistics) and SUDAAN ( $P$ -value calculations).

**Results:**

Root canals had significantly lower biovolume values than the isthmuses ( $P < 0.05$ ). The biovolume in the root canals was significantly reduced in all the experimental groups in all the

thirds except for conventional irrigation in the apical third ( $P > 0.05$ ). In the cervical and middle thirds, ultrasonic activation was associated with the lowest biovolumes ( $P < 0.05$ ), followed by XP-endo Finisher. In the isthmus, disinfection was similar in all the thirds for all the protocols. Conventional irrigation was associated with intermediate values with no significant differences from the control group or from the activated protocols ( $P > 0.05$ ), although the latter were significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

No differences were found between ultrasonic activation and XP-endo Finisher in the middle and apical thirds ( $P > 0.05$ ) in the isthmuses.

**Conclusions:**

In root canals, ultrasonic and XP-endo Finisher activation of the combined solution of NaOCl and HEBP showed a higher efficacy than conventional irrigation. In the isthmuses, no differences were observed between the two activation methods and conventional irrigation.

In relation to the thirds, the apical third of the root canals was the most difficult to disinfect compared to the other thirds, with conventional irrigation with the combined solution of NaOCl and HEBP being the least effective method. In the isthmuses, none of the activation methods succeeded in reducing microbial biofilms in all three thirds.

**Keywords:** conventional irrigation, isthmus, mandibular molar, root canal irrigation, ultrasonic activation, XP-endo Finisher.

# **1. INTRODUCCIÓN**

---



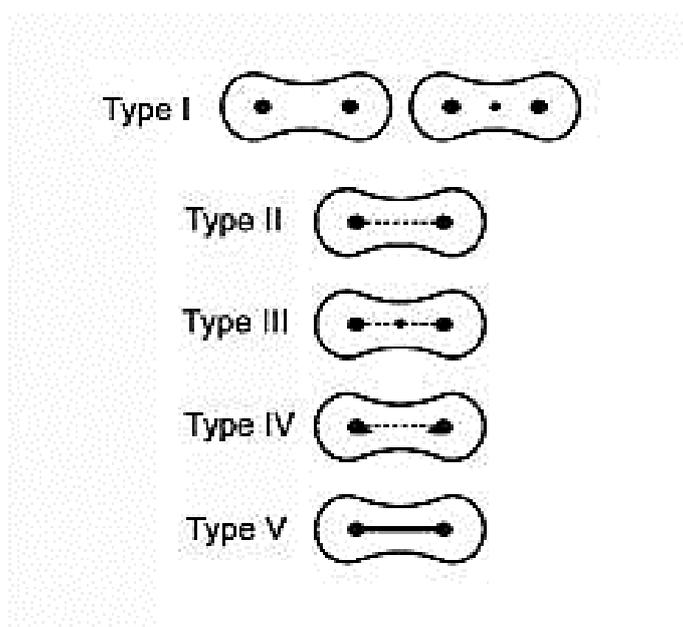
## 1.1. ANATOMÍA DE LOS ISTMOS DENTALES

Un istmo es una comunicación estrecha entre dos conductos radiculares (Weller *et al.*, 1995; Sahar-Helft *et al.*, 2015) que contiene cantidades variables de tejido pulpar. Se define también con el nombre de anastomosis y se forma cuando el conducto radicular emerge de la parte coronal de la raíz y se fusiona en la porción media de la misma. Cuando la pulpa dental se infecta, los istmos son invadidos por bacterias y sus productos metabólicos (Cambruzzi & Marshall, 1983), incrementando la posibilidad de fracaso en el tratamiento endodóntico (Moorer & Wesselink, 1982). Además, en ellos se acumulan biopelículas bacterianas y restos de dentina producidos durante la instrumentación del conducto radicular (Nair *et al.*, 2005). Los istmos se clasifican en completos o parciales. Una conexión continua entre dos conductos radiculares principales es considerada un istmo completo, mientras que una proyección estrecha de un conducto hacia otro sin que haya fusión es clasificado como istmo parcial (Tinelli M, 2011).

Según un estudio llevado a cabo por Estrela *et al.* los istmos son estructuras anatómicas frecuentes en los dientes humanos permanentes, siendo los primeros molares mandibulares los que los presentan con mayor frecuencia (87,9%) (Estrela *et al.*, 2015). En cuanto a la distancia a la que se ubican del ápice radicular, los istmos de la raíz mesiovestibular de los primeros molares maxilares y de la raíz mesial de los primeros molares mandibulares se encontraron con más frecuencia a una distancia entre 3 y 5 mm (Weller *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 2003). Los istmos completos o parciales se hallaron a 4 mm del ápice en el 100% de los casos en los molares maxilares (Weller *et al.*, 1995), mientras que en otro estudio se hallaron istmos parciales con más frecuencia que los completos en los molares mandibulares (Teixeira *et al.*, 2003).

En 1997 Hsu y Kim identificaron cinco tipos de istmos (**Figura 1.1.**):

- Tipo I: dos o tres conductos sin comunicación.
- Tipo II: dos conductos con una conexión definida entre ellos.
- Tipo III: tres conductos con una conexión definida entre ellos.
- Tipo IV: los conductos se extienden al área del istmo.
- Tipo V: hay una conexión verdadera o un pasillo completo a través de la sección.



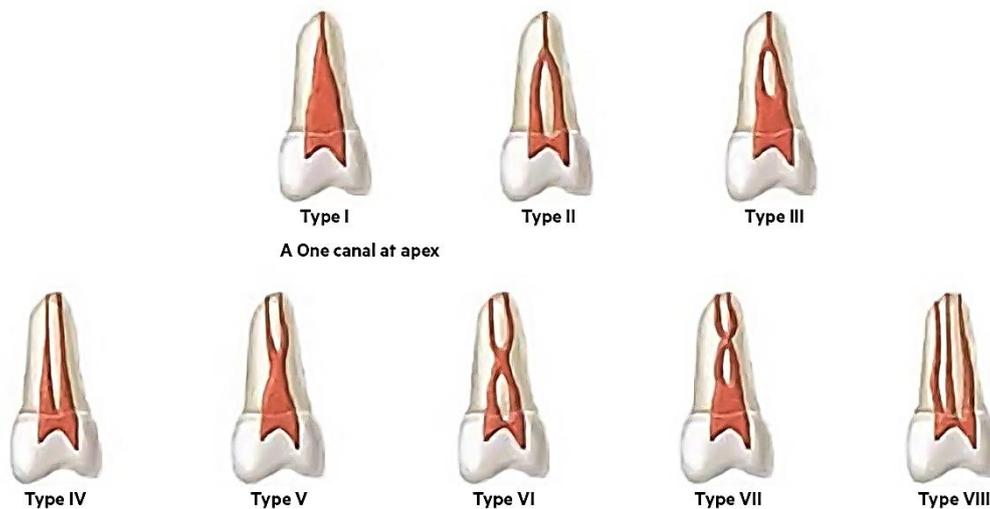
**Figura 1.1.** Esquema de los tipos de istmo según Hsu y Kim (extraído de Vertucci, 2005)

En los molares superiores e inferiores, el istmo tipo V fue el más común (28.8%). En la raíz mesial del primer y segundo molar mandibular, el tipo IV tuvo la mayor incidencia (36% y 23,9%, respectivamente). Además, se concluyó que el istmo se encontró ampliamente distribuido en raíces planas, con un bajo porcentaje en áreas cercanas al ápice. En los molares superiores e inferiores, los istmos se encontraron con mayor frecuencia a 7 mm del ápice (Lima *et al.*, 2014).

Además de los istmos, es necesario tener en cuenta la anatomía del sistema de conductos radiculares. La clasificación propuesta por Vertucci (Vertucci, 2005) es la siguiente (**Figura 1.2.**):

- Tipo I: un conducto único se extiende desde la cámara pulpar hasta el ápice.
- Tipo II: dos conductos separados salen de la cámara pulpar y se unen cerca del ápice para formar un conducto.
- Tipo III: un conducto sale de la cámara pulpar, se divide en dos que se funden a nivel del tercio apical para salir como uno solo.
- Tipo IV: dos conductos distintos y separados se extienden desde la cámara pulpar hasta el ápice.
- Tipo V: un conducto sale de la cámara pulpar y se divide cerca del ápice en dos conductos distintos, con forámenes apicales separados.

- Tipo VI: dos conductos separados salen de la cámara pulpar, se funden en el cuerpo de la raíz y vuelven a dividirse cerca del ápice para salir como dos conductos distintos.
- Tipo VII: un conducto sale de la cámara pulpar, se divide y después vuelve a unirse en el cuerpo de la raíz, y finalmente se divide otra vez en dos conductos distintos cerca del ápice.
- Tipo VIII: tres conductos distintos y separados se extienden desde la cámara pulpar hasta el ápice.



**Figura 1.2.** Representación esquemática de la configuración de los conductos basada en el trabajo de Vertucci (extraído de Hargreaves *et al.*, 2016).

## 1. 2. INFECCIÓN ENDODÓNTICA

### 1.2.1. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN ENDODÓNTICA

La infección endodóntica es aquella que afecta a la pulpa dental. La pulpa es un paquete vasculonervioso que se ubica en el interior de la cavidad pulpar situada en el interior del diente. Esta cavidad está delimitada en toda su anatomía por dentina, que es un tejido mineralizado que presenta una microestructura tubular, la cual se extiende desde la cámara pulpar hasta la unión amelodentinaria (Pashley, 1989). Está cubierta en la porción coronal por un tejido muy mineralizado llamado esmalte y por cemento en la porción radicular.

Los tejidos mineralizados del diente actúan como una barrera física que protege a la pulpa frente a agresiones externas. Por otro lado, la pulpa se encuentra en relación con el sistema vascular y nervios del resto del organismo a través del agujero o foramen apical. Estas dos particularidades, sumada a la ausencia de una circulación sanguínea colateral, determinan la

dificultad significativa en la reparación de las lesiones inflamatorias que tienen lugar en la pulpa dental (Liébana Ureña J, 2002).

Las principales causas que pueden alterar las barreras físicas que protegen la pulpa son de origen exógeno. Éstas a su vez pueden ser de origen físico (un traumatismo dental), de origen químico (por agentes químicos como blanqueadores), y de origen microbiano. En relación a esta última, la invasión microbiana de la pulpa se produce por distintas vías:

- Por comunicación directa de la cavidad oral y la cámara pulpar:  
Es la vía más común, siendo la caries dental la más frecuente, pero también puede ocurrir debido a fracturas dentales, grietas en el esmalte y procedimientos dentales iatrogénicos (Mouton C & Robert JC, 1995).
- A través de los túbulos dentinarios:  
La llegada de los microorganismos ocurre a través de los túbulos dentinarios, generalmente a través de una cavidad de caries, ya sea por contaminación directa de las bacterias o mediante sus toxinas o productos derivados de su metabolismo (Mouton C & Robert JC, 1995)
- Por vía periodontal:  
Se produce por comunicación entre el tejido periodontal infectado y el tejido pulpar a través de los conductos accesorios o el foramen apical (Mouton C & Robert JC, 1995).

Los microorganismos constituyen un factor etiológico fundamental en el desarrollo y progresión de la enfermedad pulpar y periapical (Kakehashi *et al.*, 1965; Bergenholtz, 1974). Aunque éstos participan en muchas relaciones beneficiosas, se comportan como patógenos oportunistas cuando acceden a una zona del organismo normalmente estéril, como ocurre en la pulpa dental. Cuando la integridad de los tejidos que protegen a la pulpa se pierde (Love, 1996; Haapasalo *et al.*, 2003), se favorece la invasión microbiana de la pulpa originando una infección endodóntica primaria. Dicha infección tiene un carácter polimicrobiano y mixto (Siqueira *et al.*, 2002; Munson *et al.*, 2002). Las infecciones endodónticas persistentes y secundarias son aquellas que se originan por la persistencia de microorganismos y la filtración coronapical tras realizar el tratamiento endodóntico y da lugar al fracaso de dicho tratamiento. El factor decisivo que influye, por tanto, en el éxito del tratamiento a largo plazo es la persistencia de microorganismos (Nair *et al.*, 1990; Siqueira *et al.*, 2002; Noiri *et al.*, 2002; Ricucci *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009) o la llegada de nuevos, ya que representan un riesgo latente para que el tratamiento fracase (Sjögren *et al.*, 1990; Eddy *et al.*, 2005). Los microorganismos supervivientes deben adaptarse a las nuevas condiciones medioambientales para poder vivir y mantener la inflamación (Siqueira,

2011). Estos microorganismos persistentes suelen ser anaerobios facultativos y muestran una escasa actividad metabólica debido a la escasez de nutrientes en el conducto radicular tratado. Esto les hace más resistentes tanto a las nuevas condiciones presentes, como al tratamiento y a los agentes desinfectantes (Haapasalo *et al.*, 2003; Waltimo *et al.*, 2003). Por otro lado, estos microorganismos generalmente se encuentran en áreas de difícil acceso para los instrumentos y sustancias antimicrobianas que se emplean durante el tratamiento, como son los istmos, canales laterales y las ramificaciones (Nair *et al.*, 1990; Nair *et al.*, 2005; Ricucci *et al.*, 2009; Ricucci & Siqueira, 2010), incluso en las paredes del conducto radicular a las que los instrumentos no llegan (Peters *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2011).

### 1.2.2. BIOPELÍCULAS MICROBIANAS

La cavidad oral está colonizada por una amplia diversidad de microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos, protozoos y arqueobacterias, denominados en conjunto como el “microbioma oral” (Wade, 2013). Cabe destacar que es el segundo microbioma más complejo en el cuerpo humano, después del colon (Huttenhower *et al.*, 2010). Hoy en día se sabe que la forma más común de organización de los microorganismos en los ecosistemas, incluyendo los de la cavidad oral y los conductos radiculares, es en forma de biopelículas.

Una biopelícula bacteriana es una estructura compleja formada por una comunidad microbiana mixta y huecos intersticiales, adherida a un material o interfase que puede ser de naturaleza abiótica o biótica (Costerton, *et al.*, 1999). Los microorganismos que componen la biopelícula están unidos por una matriz de polímeros extracelulares (EPS, *Exo-Polymeric Substance*) que son producidos y excretados por ellos mismos (Costerton *et al.*, 1999; Leonardo *et al.*, 2002; Nair, 2006). La matriz de EPS es el principal agente estructural de las biopelículas. Entre sus funciones se encuentran permitir, establecer y mantener asociaciones entre microorganismos y entre éstos y su medio ambiente, constituye un reservorio de energía y carbono y actúa como protección frente a la desecación, agentes antimicrobianos y a células del sistema inmune (Decho, 2000; Liu *et al.*, 2002; James *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2010; Bjarnsholt, 2013).

Las biopelículas se forman a partir de bacterias planctónicas que se adhieren a una superficie. La adhesión de los colonizadores primarios genera una señal para la expresión de genes específicos de la biopelícula. Estos genes codifican proteínas que actúan como señales para la coagregación de los colonizadores secundarios y, el inicio de la formación de la matriz de EPS. A medida que se van acumulando, estas moléculas actúan como agentes quimiotácticos e

inductores de un mecanismo denominado “*Quorum Sensing*” que favorece la formación y maduración de la biopelícula (Ran *et al.*, 2015) (**Figura 1.3.**).

Las bacterias que forman parte de las biopelículas son considerablemente más resistentes a agentes tóxicos que como célula individual, principalmente por diversos factores:

- La biopelícula como tal actúa como una barrera física y química, evitando el paso de agentes tóxicos y manteniendo un ambiente adecuado para la supervivencia (Stewart *et al.*, 1998; Mah & O'Toole, 2001; Khemaleelakul *et al.*, 2006; Chávez de Paz, 2007).
- Las bacterias de una biopelícula tienen la capacidad de comunicarse entre sí mediante el *Quorum Sensing*, que representa una vía de señalización que se activa como respuesta a la densidad celular, permitiendo que las bacterias puedan coordinar su actividad en función del tamaño de la población mediante la alteración de su expresión génica (Schuster *et al.*, 2003; Kuboniwqa *et al.*, 2012; Struzycka, 2014).
- Los microorganismos que coexisten en un mismo hábitat ponen en marcha la maquinaria genética capaz de neutralizar el agente microbiano, de forma que incluso se puede llegar a decir que se produce un cambio en el fenotipo de la biopelícula (Cloete, 2003).
- El número de bacterias concentradas en una biopelícula es muy superior y ofrece la posibilidad de liberar enzimas en concentraciones mayores a las que podrían ser liberadas en medio libre; estas enzimas serían las responsables de modificar los agentes antimicrobianos y transformarlos a formas no tóxicas. Además, la proximidad entre las células fomenta el intercambio de la información genética por distintos mecanismos como transferencia de plásmidos, incluyendo genes de resistencia a antimicrobianos (Davies, 2003; Roberts & Mullany, 2010).
- El bajo nivel metabólico en una biopelícula ante situaciones de escasez de nutrientes aumenta la resistencia frente a agentes biocidas debido a que la principal función no es multiplicarse, sino asegurar la persistencia de la biopelícula, lo que es esencial para prevenir una acumulación de residuos metabólicos o el agotamiento de los nutrientes (Huang *et al.*, 1995; Scheie & Petersen, 2004).
- Dentro de una biopelícula existe heterogeneidad ambiental, lo cual podría favorecer a su vez la formación de una población heterogénea permitiendo la expresión de diferentes niveles de resistencia en toda la comunidad microbiana (Mah & O'Toole, 2001).

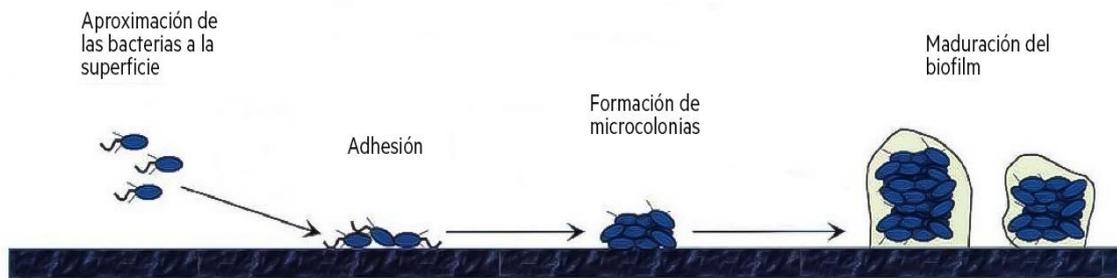


Figura 1.3. Fases de la formación de la biopelícula (extraído de Schlapp, 2009)

### 1.3. ENTEROCOCCUS COMO PATÓGENO EN INFECCIONES ENDODÓNTICAS

#### 1.3.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO *ENTEROCOCCUS*

Los enterococos son microorganismos con forma de cocos, Gram-positivos que se observan aislados, en parejas o bien en cadenas cortas. Son microorganismos anaerobios facultativos y poseen superóxido dismutasa y peroxidasa (Sjögren *et al.*, 1990; Piard & Desmazeaud, 1992). Son capaces de catabolizar una gran variedad de fuentes energéticas como glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina y  $\alpha$ -ceto ácidos. Además, son resistentes a las sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, azida y a la desecación (Stuart *et al.*, 2006). Son capaces de sobrevivir en condiciones ambientales muy adversas, de modo que soportan niveles de pH alcalinos (9,6) así como elevadas concentraciones de cloruro sódico. Crecen entre 10 y 45 °C y sobreviven a 60 °C durante 30 minutos (Tendolkar *et al.*, 2003). Los enterococos se encuentran habitualmente entre los tres principales patógenos bacterianos implicados en infecciones nosocomiales, además de ser comensales del tracto gastrointestinal y vagina. Pueden causar multitud de enfermedades en el tracto urinario, endocardio, abdomen, tracto biliar y también pueden causar otitis, neumonía y meningitis (Richards *et al.*, 2000).

#### 1.3.2. *ENTEROCOCCUS* EN INFECCIONES ENDODÓNTICAS

Los enterococos están considerados microbiota transitoria de la cavidad oral ya que raramente se aíslan en personas que presentan salud bucal. La principal vía de entrada parece ser la comida (Al-Ahmad *et al.*, 2010), concretamente a través de lácteos, carnes, vegetales y aceitunas (Franz *et al.*, 2003). Habitualmente son eliminados de la cavidad oral aunque en ocasiones pueden permanecer e ingresar en los conductos radiculares a través de lesiones de caries profundas y restauraciones deficientes e intervenir en la infección endodóntica (Ferrari *et al.*, 2005). Los enterococos tienen la capacidad de penetrar en los túbulos dentinarios y no

pueden ser eliminados por completo durante la preparación del conducto radicular, por tanto, representan uno de los factores etiológicos del fracaso endodóntico (Denotti *et al.*, 2009; Karale *et al.*, 2011).

Los conductos radiculares necróticos o deficientemente obturados constituyen un hábitat ideal para *Enterococcus*, especialmente para *Enterococcus faecalis*. La prevalencia de esta especie es mayor en infecciones endodónticas secundarias o persistentes que en infecciones primarias (Rôças *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Sedgley *et al.*, 2006). Estudios recientes consideran que esta bacteria casi siempre está presente en dientes con fracaso endodóntico, pero en bajo porcentaje (Rôças & Siqueira, 2012; Endo *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2017). Sin embargo, cabe señalar que, otros estudios no consideran a esta especie como el microorganismo prevalente asociado a dicho fracaso, siendo otros microorganismos encontrados con mayor frecuencia, tales como *Parvimonas micra*, *Solobacterium moorei* y *Fusobacterium nucleatum* (Schirmesiter *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2013). Además hay que destacar que, estudios recientes llevados a cabo usando técnicas de secuenciación de nueva generación confirman en cierta medida que *E. faecalis* se detecta preferentemente en periodontitis apical secundaria (PAS), pero en frecuencias significativamente bajas; de este modo, Zandi *et al.* en su trabajo encontraron una prevalencia de esta bacteria en el 20% de los casos, mientras que en el estudio de Boullaguet *et al.* fue del 32% y según los resultados de la investigación llevada a cabo por Siqueira *et al.* la prevalencia de *E. faecalis* fue del 40%. Curiosamente, a pesar de los valores de prevalencia más bajos, *E. faecalis* podría alcanzar cantidades medias bastante altas; 14% en Zandi *et al.* y 20% en Bouillaguet *et al.*, lo cual indica que algunos conductos radiculares soportan cargas considerablemente altas de *E. faecalis* (Siqueira *et al.*, 2016; Zandi *et al.*, 2018; Bouillaguet *et al.*, 2018).

*E. faecalis* posee una amplia variedad de factores de virulencia, entre los que se incluyen: enzimas líticas, citolisina, sustancias de agregación y ácidos lipoteicoicos. Por otro lado, *E. faecalis* es capaz de provocar inhibición linfocitaria lo cual contribuye potencialmente al fracaso del tratamiento de conductos (Lee *et al.*, 2004).

Sin embargo, la resistencia de esta bacteria no depende tanto de sus factores de virulencia como de su capacidad para sobrevivir y persistir como patógeno en el interior de los conductos radiculares (Rôças *et al.*, 2004), lo que consigue por diversos motivos:

- Presenta una amplia variedad de polimorfismos genéticos (Sedgley *et al.*, 2004).

- Produce gelatinasa y proteína de unión al colágeno (Ace) que le ayuda a unirse a la dentina (Hubble *et al.*, 2003).
- Su tamaño es lo suficientemente pequeño como para invadir, así como vivir en los túbulos dentinarios (Love, 2001).
- Puede subsistir largas temporadas de escasez de nutrientes y utilizar el suero de la dentina y del ligamento periodontal como fuente de alimento (Figdor *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2006). Además, el suero procedente del espacio periapical le sirve de ayuda para unirse al colágeno tipo I (Love, 2001). Resiste en el interior de los túbulos a la medicación intraconducto con hidróxido de calcio durante más de 10 días (Orstavik & Haapasalo, 1990). Esto lo consigue mediante mecanismos de regulación genética responsables de la adaptación de esta bacteria a condiciones de estrés alcalino (Ran *et al.*, 2015).
- Es capaz de crecer en ambientes con poco oxígeno y pH alcalino, soporta un amplio rango de temperaturas entre 10° y 60°C, y ambientes pobres en nutrientes (Pinheiro *et al.*, 2003; Rôças *et al.*, 2004; Narayanan *et al.*, 2010; Jhajharia *et al.*, 2015).
- Lleva a cabo fenómenos de transferencia de genes, algunos de ellos relacionados con la virulencia ayudándole a colonizar y competir con otras bacterias y a resistir los mecanismos de defensa del huésped (Del Fabbro *et al.*, 2014).
- Interviene en la calcificación de la placa o biopelícula dental mediante la precipitación de iones calcio y fosfato (Del Fabbro *et al.*, 2014).
- Crece formando biopelículas siendo más resistentes a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos que cuando crece en forma planctónica (Distel *et al.*, 2002).

#### 1.4. TRATAMIENTO ENDODÓNTICO

El principal objetivo del tratamiento endodóntico es eliminar o reducir significativamente las biopelículas microbianas del sistema de conductos radiculares y conseguir un adecuado sellado del mismo que prevenga una posible reinfección. Por ello, el éxito del tratamiento endodóntico depende en cierta medida de la correcta eliminación de dichos microorganismos. Algunos estudios han demostrado que incluso tras la desinfección químico-mecánica y la obturación de los conductos radiculares, las biopelículas bacterianas pueden persistir en el interior del sistema de conductos. Es por esto que es de vital importancia el desarrollo de estrategias de desinfección endodónticas que garanticen la eliminación efectiva de estas biopelículas (Kishen, 2010).

El tratamiento endodóntico se lleva a cabo mediante la preparación químico-mecánica (instrumentación e irrigación) y, en ocasiones, la aplicación de medicación intraconducto. La instrumentación de los conductos radiculares mediante el uso de limas manuales o rotatorias no elimina completamente su contenido debido a la complejidad de la anatomía transversal del sistema de conductos por lo que, para la limpieza y desinfección de las paredes, conductos laterales y accesorios y túbulos dentinarios es necesaria la irrigación (Haapasalo *et al.*, 2000). Se ha demostrado mediante estudios de micro-tomografía computerizada, que el 11%-48% de las áreas de los conductos radiculares principales permanecen intactos después de la instrumentación, pudiendo mantener biopelículas tras el tratamiento (Paqué *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2015). Además, ciertas complejidades anatómicas del sistema de conductos tales como ramificaciones e istmos, no son comúnmente alcanzadas ni por los instrumentos ni por los irrigantes, por lo que las bacterias localizadas en estas áreas pueden persistir e inducir un fracaso en el tratamiento (de Gregorio *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2012; Keles *et al.*, 2016). La limpieza y desinfección adecuadas del área del istmo es por tanto un desafío (Adcock *et al.*, 2011, Endal *et al.*, 2011; Markvart *et al.*, 2012; Neelakantan *et al.*, 2016; Rôças *et al.*, 2016).

La irrigación es el procedimiento mediante el cual se distribuye un líquido o irrigante en el sistema de conductos radiculares antes, durante y tras la instrumentación. Los objetivos de la irrigación son la eliminación del tejido pulpar, restos de dentina y barrillo dentinario generados durante la instrumentación, así como las biopelículas microbianas de las paredes de los conductos radiculares y del interior de los túbulos dentinarios. El irrigante debe a su vez lubricar los instrumentos empleados durante el tratamiento (Siqueira *et al.*, 2002). Cuando las soluciones irrigadoras entran en el interior del sistema de conductos radiculares, interaccionan con los elementos presentes en el conducto tales como la pulpa, los microorganismos, el barrillo dentinario y los detritus de dentina. Dicha interacción puede afectar en mayor o menor medida a la acción de las soluciones, inactivando o reduciendo su eficacia (Haapasalo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013).

#### **1.4.1. BARRILLO DENTINARIO**

La acción de los instrumentos sobre las paredes de dentina genera una capa de residuos denominada barrillo dentinario, y favorece el acumulo y retención de residuos de dentina en zonas a las que no llegan los instrumentos (Hartman *et al.*, 2007; Paqué *et al.*, 2005). El barrillo dentinario es una capa de unas 2.5 micras de espesor que se extiende por la superficie tratada y que penetra unas pocas micras en el interior de los túbulos dentinarios (Eick, 1970). Está

compuesto por residuos orgánicos e inorgánicos que incluyen dentina, restos de odontoblastos, tejido pulpar y bacterias (McComb & Smith, 1975). Su composición varía a medida que se instrumentan los conductos. En un principio contiene mayor cantidad de materia orgánica y conforme avanza la instrumentación y se va eliminando esa materia orgánica infectada aumenta su contenido en materia inorgánica que es más difícil de eliminar (Jodaikin & Austin, 1981). Lester y Boyde asumieron que estaba formado mayoritariamente por materia inorgánica ya que no era posible removerlo mediante irrigaciones de hipoclorito de sodio (Lester & Boyde, 1977).

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

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

- Contiene bacterias, sus productos de desecho y materia orgánica necrótica (Cunningham *et al.*, 1982; Yamada *et al.*, 1983) que pueden actuar como sustrato y alimento para las bacterias supervivientes o nuevas que acceden al conducto (George *et al.*, 2005).
- Limita el contacto directo de los agentes antimicrobianos con los microorganismos.
- Limita la penetración de los agentes desinfectantes en el sistema de conductos radiculares y túbulos dentinarios (Hartmann *et al.*, 2007).
- Dificultan el sellado óptimo del sistema de conductos radiculares (White *et al.*, 1984; Foster *et al.*, 1993).

### 1.5. SOLUCIONES IRRIGADORAS

Durante la preparación químico-mecánica del sistema de conductos radiculares, las soluciones irrigadoras actúan como antisépticos, lubricantes y agentes de limpieza, que ayudan a eliminar barrillo dentinario, tejido pulpar y bacterias.

Hasta la fecha no se conoce una solución irrigadora que actúe sobre toda esta materia orgánica e inorgánica. Por ello, el protocolo de irrigación más aceptado incluye el uso de una solución antimicrobiana durante el tratamiento endodóntico seguido de una solución quelante fuerte (Zehnder M, 2006; Neelakantan *et al.*, 2012). El hipoclorito sódico (NaClO) y la clorhexidina (CLX) son las soluciones irrigadoras con acción antimicrobiana más usadas en endodoncia; sin embargo, estas no eliminan el componente inorgánico del barrillo dentinario ni los residuos de dentina que se crean tras la instrumentación mecánica. Es por eso que se emplean junto a soluciones ácidas y quelantes como el EDTA (Silva *et al.*, 2014) y los ácidos cítrico y fosfórico, entre otros (Hülsmann *et al.*, 2003). Las propiedades principales de estas soluciones de irrigación se encuentran resumidas en la **Tabla 1.1**.

**Tabla 1.1.** Propiedades de las soluciones irrigadoras frecuentemente usadas en endodoncia.

| Compuesto (concentraciones recomendadas) | Tipo                 | Actividad antimicrobiana sobre suspensión | Actividad antimicrobiana sobre biopelículas | Disolución de tejido | Eliminación del barrillo dentinario | Biocompatibilidad |
|--|----------------------|---|---|----------------------|-------------------------------------|-------------------|
| <b>NaClO</b><br>(0.5% - 6%)              | Compuesto halogenado | +++                                       | +++   | +++                  | ++ sobre compuestos orgánicos       | d.d.c.            |
| <b>CLX</b><br>(0.2% - 2%)                | Bisguanida catiónica | ++  | ++  | -                    | -                                   | ++                |
| <b>EDTA</b><br>(10% - 17%)               | Quelante             | +   | +   | -                    | ++ sobre compuestos inorgánicos     | ++                |
| <b>Ácido cítrico</b><br>(10% - 50%)      | Ácido orgánico       | +   | +   | -                    | +++ sobre compuestos inorgánicos    | ++                |

-: ausente o mínima; +: baja; ++: media; +++: elevada; d.d.c.: depende de la concentración. Tabla adaptada de Zehnder *et al.*, 2006.

### 1.5.1. HIPOCLORITO DE SODIO (NaClO)

Es la solución irrigadora más empleada para la irrigación del conducto radicular por su elevada eficacia antimicrobiana (Hargreaves *et al.*, 2016). Se trata de un compuesto halogenado cuyas funciones biológicas principales son disolver los restos de tejido pulpar y el componente orgánico del barrillo dentinario, así como destruir bacterias neutralizando sus metabolitos y productos antigénicos (Byström & Sundqvist, 1985). Además, se caracteriza por presentar un amplio espectro antibacteriano, es esporicida y viricida (McDonnell & Russell, 1999). Es barato, altamente disponible y, cuando se utiliza correctamente tiene una baja toxicidad (Moorer &

Wesselink, 1982). Posee un pH alcalino y su concentración óptima para eliminar las bacterias del sistema de conductos radiculares es entre 0,5% y 6% (Jiménez-Rubio *et al.*, 1997).

En el sistema de conductos, el NaClO reacciona con la materia orgánica representada por los microorganismos, el tejido pulpar y el componente orgánico de la dentina, lo que resulta en una pérdida/consumo del cloro disponible (Macedo *et al.*, 2010). Esto hace que las soluciones de NaClO ejerzan un potente pero corto efecto. Adicionalmente cabe señalar que, la actividad antimicrobiana del NaClO depende de su concentración; sin embargo, mientras más concentrado sea, mayor es su toxicidad (Torabinejad *et al.*, 2003).

Una de las mayores desventajas del NaClO en el tratamiento endodóntico es su incapacidad para eliminar la capa de barrillo y los residuos de dentina generados durante la instrumentación. Además, como desventaja adicional está su efecto citotóxico cuando se extruye fuera del sistema de conductos hacia los tejidos periapicales (Gomes *et al.*, 2001).

### 1.5.2. ÁCIDO ETIDRÓNICO (HEDP)

Para eliminar la capa de barrillo y los residuos de dentina se utilizan agentes quelantes como el EDTA y el ácido cítrico. Su desventaja es que erosionan y descalcifican en exceso la dentina, aumentando la permeabilidad y disminuyendo la microdureza (Hennequin *et al.*, 1994; Rotstein *et al.*, 1996; Dogan & Qalt, 2001). Por otro lado, estas soluciones quelantes reaccionan fuertemente con el NaClO disminuyendo su eficacia si son empleados en combinación (Zehnder *et al.*, 2005; Grawehr *et al.*, 2003).

Recientemente se ha propuesto el ácido etidrónico, 1-hidroxi etiliden-1,1-difosfónico (HEDP), un quelante débil no tóxico que se emplea para tratar enfermedades de huesos (Russell & Rogers, 1999). Este agente tiene la capacidad de eliminar el barrillo dentinario de una forma similar al EDTA (De-Deus *et al.*, 2008) pero es menos agresivo que éste y, como consecuencia, tiene un efecto mínimo sobre la dentina (De-Deus *et al.*, 2008; Paqué *et al.*, 2012). Otra ventaja es que se puede usar junto con el NaClO sin causarle pérdida de su actividad biológica a corto plazo (Arias-Moliz *et al.*, 2016).

De esta forma, la combinación de NaClO y HEDP ha demostrado una capacidad similar a NaClO para eliminar y matar biopelículas de *E. faecalis* crecidas sobre superficie de dentina (Arias-Moliz *et al.*, 2016) y en el interior de los túbulos dentinarios (Arias-Moliz *et al.*, 2014), manteniendo la capacidad de disolver tejido orgánico (Tartari *et al.*, 2015; Tejada *et al.*, 2019). Además, cuando

se usa en combinación con NaClO, reduce la formación de barrillo dentinario y previene el acumulo de detritus de dentina en zonas no instrumentadas (Lottanti *et al.*, 2009; Paqué *et al.*, 2012) por lo tanto, permitiendo al NaClO ejercer su acción antimicrobiana (Girard *et al.*, 2005). También cabe destacar que, cuando se activa la solución combinada de NaClO y HEDP tiene mayor eficacia antimicrobiana frente a biopelículas de *E. faecalis* (Neelakantan *et al.*, 2015). La presencia de HEDP en la mezcla no aumenta la toxicidad (Ballal *et al.* 2019a) y, hasta la fecha, no se han publicado efectos adversos cuando se ha empleado clínicamente (Ballal *et al.* 2019b).

Por todas esas características, la combinación de NaClO y HEDP parece ser una alternativa eficaz y podría ser utilizada como único irrigante durante y después del proceso de instrumentación en el tratamiento endodóntico (Tartari *et al.*, 2015). La concentración de las soluciones en la combinación es NaClO al 2,5% + ácido etidróico al 9% (ambos en concentración final).

## 1.6. ACTIVACIÓN DE LAS SOLUCIONES IRRIGADORAS

Como ya se ha comentado, conseguir un elevado efecto antimicrobiano es posiblemente el requisito más importante para alcanzar el éxito en el tratamiento endodóntico. Sin embargo, incluso la mejor solución irrigadora no cumplirá este objetivo si no es capaz de alcanzar las bacterias y los restos de tejido en cantidades suficientes. Por lo tanto, emplear técnicas de irrigación y activación/agitación que sean eficaces es igualmente importante para garantizar una adecuada distribución de las soluciones a lo largo de todo el sistema de conductos radiculares. Además, estas soluciones deben ser renovadas adecuadamente, a fin de mantener a los irrigantes en concentraciones activas.

Las técnicas de irrigación deben también crear un flujo de la solución irrigadora con el objetivo de transportar las bacterias, los fragmentos de biopelícula y los restos de tejido hacia fuera del conducto radicular, contribuyendo así a la limpieza mecánica del sistema de conductos.

Durante la irrigación surgen diversos problemas como la formación de burbujas de aire o efecto “vapor lock”, que impide el movimiento de los irrigantes hacia los estrechos confines del sistema de conductos radiculares, tales como los istmos y los conductos laterales. Esto explica en parte por qué ningún régimen de irrigación parece ser capaz de proporcionar un conducto completamente limpio (Raisingani & Meshram, 2010; Siqueira & Rôças, 2011). En condiciones *in vivo*, el NaClO reacciona químicamente con el material orgánico dentro del conducto radicular

y libera cantidades abundantes de amonio y dióxido de carbono; esta mezcla gaseosa es atrapada en la región apical y da lugar a una burbuja de aire donde la penetración de fluidos es imposible. Los instrumentos no reducen esta burbuja de aire ni eliminan las burbujas de gas (Schoeffel GJ, 2008). Se ha aceptado ampliamente que la única forma efectiva de limpiar áreas complejas del sistema de conductos radiculares, como los istmos, es a través del movimiento de la solución de irrigación (Gutarts *et al.*, 2005).

Los sistemas de irrigación del conducto se pueden dividir en dos grupos principales, técnicas de agitación manual y dispositivos de agitación asistidos por máquina. La agitación manual consiste en la irrigación con fuerzas positivas, comúnmente mediante el uso de jeringas y agujas con ventilación lateral. Mientras que, la agitación mecánica utiliza dispositivos sónicos o ultrasónicos para activar la solución dentro del conducto radicular. Adicionalmente, también se han recomendado sistemas de irrigación a presión negativa para mejorar el intercambio de irrigación en el tercio apical de la raíz, y limas rotatorias de plástico (Nielsen & Baumgartner, 2007; Bahcall & Oslen, 2007; Chopra *et al.*, 2008; de Gregorio *et al.*, 2009). Recientemente se ha propuesto además, el uso de una nueva lima metálica rotatoria no cónica, denominada XP-endo Finisher, como técnica de agitación de las sustancias de irrigación (Bao *et al.*, 2017).

### **1.6.1. IRRIGACIÓN CONVENCIONAL CON JERINGA Y AGUJA**

La irrigación convencional con jeringa y aguja ha sido recomendada como un método eficaz de administración de irrigación (van der Sluis *et al.*, 2006). Esta técnica consiste en distribuir un irrigante en el interior del sistema de conductos a través de agujas de calibres variables, ya sea pasivamente o con agitación. Lo último se consigue moviendo la aguja hacia arriba y hacia abajo en el interior de los conductos radiculares. Estas agujas están diseñadas para dispensar un irrigante ya sea por el extremo más distal, o por ventilación lateral (Kahn FH *et al.*, 1995). El último diseño se ha propuesto para mejorar la activación hidrodinámica del irrigante y reducir la posibilidad de extrusión apical (Hauser *et al.*, 2007). Es fundamental que la aguja permanezca holgada en el interior del conducto durante la irrigación, ya que permite que el irrigante produzca un movimiento de fluidos, que tiene una acción de enjuague y puede desalojar desechos y microorganismos de las paredes del conducto radicular hacia la superficie coronal, al tiempo que evita la extrusión de éste hacia los tejidos periapicales. Una de las ventajas de la irrigación con jeringa es que permite un fácil control de la profundidad de penetración de la aguja dentro del conducto y del volumen de irrigante.

El alcance de la acción de enjuague que se logra cuando se emplea la irrigación con jeringa es muy modesto, ya que los irrigantes a menudo no alcanzan más de 1 mm de profundidad que la punta de la aguja. La extensión del fluido está determinada por el diámetro del conducto, la forma de la sección transversal del conducto, la profundidad de colocación y el diámetro de la aguja, que a menudo se localiza en el tercio coronal de un conducto estrecho o, en el mejor de los casos, en el tercio medio de un conducto ancho (Ram Z, 1977; van der Sluis *et al.*, 2006; Boutsoukias C *et al.*, 2010).

El método convencional de irrigación con jeringa y aguja a menudo no logra administrar y distribuir las soluciones de irrigación de manera adecuada dentro del complejo sistema de conductos radiculares, especialmente en el tercio apical y los istmos (Thomas *et al.*, 2014; Deleu *et al.*, 2015; Versiani *et al.*, 2015). La profundidad de penetración de la solución de irrigación y su capacidad para desinfectar las paredes de los conductos radiculares y los túbulos dentinarios son, por lo tanto, limitadas. Para superar esta limitación, se han propuesto métodos de activación complementaria como: la activación dinámica manual (ADM), irrigación ultrasónica pasiva (IUP), irrigación sónica (IS) o presión apical negativa (PAN) (Virdee *et al.*, 2018).

Tras la irrigación convencional con aguja y jeringa, es probable que las áreas inaccesibles del conducto y las irregularidades anatómicas alberguen desechos y bacterias. De igual manera, el efecto vapor lock que se produce puede interferir en el movimiento del irrigante, lo que dificulta el desbridamiento completo del sistema de conductos (Wu & Wesselink, 2001; Nair *et al.*, 2005; Wu Mk *et al.*, 2006; Tay FR *et al.*, 2010). Los factores que mejoran la eficacia de la irrigación con jeringas incluyen una mayor proximidad de la aguja al ápice (Goldman *et al.*, 1976; Chow TW, 1983; Sedgley, 2005), un mayor volumen de irrigación (Sedgley, 2004) y agujas de irrigación de calibre más pequeño (Chow TW, 1983).

### **1.6.2. IRRIGACIÓN ULTRASÓNICA PASIVA (IUP)**

Los instrumentos ultrasónicos son aquellos cuya frecuencia vibratoria es mayor de 20 kHz. La mayoría de los ultrasonidos dentales oscilan a frecuencias entre 25 y 30 kHz, por lo que pueden adaptarse fácilmente para la agitación de las soluciones irrigadoras (Plotino *et al.*, 2007). Gran parte de las piezas de mano ultrasónicas modernas son unidades piezoeléctricas, donde la acción de la punta es lineal, creando una acción similar a un pistón o golpeteo, con nodos y antinodos a lo largo de la punta del instrumento que se encuentra dentro de la solución irrigadora (Plotino *et al.*, 2007; Gulabivala *et al.*, 2010).

En la literatura se han descrito dos tipos de irrigación ultrasónica. El primero es una combinación simultánea de instrumentación ultrasónica e irrigación (IU). Mientras que el segundo tipo, denominado irrigación ultrasónica pasiva (IUP), funciona sin instrumentación simultánea.

El término IUP fue utilizado por primera vez por Weller para describir un panorama de irrigación donde no había instrumentación o contacto de las paredes del conducto con un instrumento endodóntico, por lo que el efecto era pasivo (Weller *et al.*, 1980; Jensen *et al.*, 1999). Con esta tecnología no cortante, se redujo el potencial de crear formas aberrantes dentro del conducto radicular. Durante la IUP, la energía se transmite desde un instrumento oscilante al irrigante en el interior del conducto radicular mediante ondas ultrasónicas. Esta energía induce la transmisión acústica (generación de un flujo) y la cavitación del irrigante (formación y colapso de burbujas de vapor) alrededor del instrumento; generándose así un movimiento continuo de éste y mejorando la eliminación de desechos (Walmsley, 1987; Ahmad *et al.*, 1987; Ahmad *et al.*, 1988; Brennen, 1995; van der Sluis *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2014). Por un lado, esta transmisión acústica causa la desaglomeración de las biopelículas bacterianas dentro del conducto radicular, pudiendo así provocar que las bacterias planctónicas resultantes sean más susceptibles a la actividad bactericida de NaClO (Joyce *et al.*, 2003). La cavitación por otro lado, puede producir un debilitamiento temporal de la membrana celular, haciendo que las bacterias sean más permeables al NaClO. La IUP también puede provocar un aumento en la temperatura del irrigante, lo que se traduce en el aumento de la concentración de cloro disponible, resultando en una disolución mayor de colágeno (Frais & Gulabivala, 2001; Woodmansey KF, 2005; Dumitriu & Dobre, 2015). Las temperaturas exactas alcanzadas no han sido bien documentadas.

La literatura endodóntica sostiene que es más ventajoso aplicar ultrasonidos después de la finalización de la preparación del conducto (Zehnder M, 2006). Además, manifiesta que la transmisión acústica se maximiza cuando las puntas de los instrumentos vibran libremente en una solución, potenciándose el efecto de micro-transmisión para la eliminación de desechos (Lumley *et al.*, 1993). Estudios clínicos e *in vitro* han demostrado una mayor eficacia de la activación ultrasónica que la irrigación convencional en la eliminación de tejido pulpar y restos de tejido duro; y aunque varios estudios han demostrado una mayor actividad antimicrobiana (Cherian *et al.*, 2016, Pladisai *et al.*, 2016, Bao *et al.*, 2017), los hallazgos aún no son concluyentes (Paiva *et al.*, 2013, Căpută *et al.*, 2019).

### **Métodos de aplicación de irrigación durante IUP**

Existen dos métodos de irrigación durante la aplicación de IUP, ya sea mediante irrigación continua a través de la pieza de mano ultrasónica, o mediante la administración intermitente del irrigante y activación posterior (Cameron JA, 1988). En la técnica de irrigación intermitente, el irrigante se introduce en el conducto radicular con una jeringa y aguja, se activa ultrasónicamente y se irriga nuevamente. La cantidad de irrigante que fluye a través del conducto se puede controlar porque se conocen tanto la profundidad de penetración de la aguja como el volumen de irrigante administrado. El irrigante se activa con el uso de un instrumento ultrasónico. El conducto radicular se enjuaga con irrigante fresco para eliminar los restos desalojados o disueltos de las paredes del conducto. Esto no es posible con el uso del régimen de lavado continuo. Ambos métodos de irrigación han demostrado ser igualmente efectivos para eliminar restos de dentina del sistema de conductos radiculares (van der Sluis *et al.*, 2006; Tanomaru *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2019) siempre y cuando el conducto radicular sea irrigado durante 3 minutos (van der Sluis *et al.*, 2009).

#### **1.6.3. IRRIGACIÓN ACTIVADA CON LIMA XP-ENDO FINISHER**

El instrumento XP-Endo Finisher (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Suiza) se presentó con la promesa de mejorar la limpieza y la desinfección del sistema de conductos radiculares mientras preserva la dentina. Se ha propuesto para ser empleado como último paso en la desinfección de conductos. Este es un instrumento no cónico de tamaño #25, hecho de aleación MaxWire de níquel-titanio (NiTi) (Martensite-Austenite Electropolish Flex). A temperatura ambiente, el instrumento es recto en su fase martensítica, pero a la temperatura corporal cambia a la fase austenítica y desarrolla una forma de cuchara (Debelian & Trope, 2015); cuando se gira y se mueve hacia arriba y hacia abajo en el interior del conducto, esta forma hace que el instrumento se expanda y se contraiga para tocar las paredes del conducto y agitar la solución irrigadora (Paiva *et al.*, 2013; Debelian & Trope, 2015), pudiendo de esta manera, ayudar a eliminar las biopelículas de áreas anatómicas de difícil acceso (Bao *et al.*, 2017). Un estudio reciente ha encontrado una mejor distribución de la solución con XP-endo Finisher en comparación con la activación ultrasónica en todo el conducto mesial de molares mandibulares, especialmente en el tercio apical (Pacheco-Yanes *et al.*, 2019). Sin embargo, otro estudio no obtuvo diferencias entre los dos sistemas de activación referente tanto a la reducción de los desechos de tejidos duros acumulados dentro del sistema de conductos radiculares, como a la

eliminación de bacterias (Leoni *et al.*, 2017; Nidambur *et al.*, 2020; Álvarez-Sagües *et al.*, 2021). Hasta ahora, algunos estudios sobre la actividad antimicrobiana de XP-endo Finisher muestran que es más eficaz que la activación ultrasónica para reducir la carga bacteriana en las paredes principales del conducto radicular y en el interior de los túbulos dentinarios (Alves *et al.*, 2016; Azim *et al.*, 2016; Bao *et al.*, 2017). Sin embargo, su actividad de limpieza y antimicrobiana dentro de las irregularidades del conducto radicular como los istmos sigue siendo un tema de debate (Alves *et al.*, 2016; Bao *et al.*, 2017; Pacheco-Yanes *et al.*, 2019).



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



El éxito del tratamiento endodóntico depende en parte de la eliminación de las biopelículas microbianas del sistema de conductos radiculares mediante procedimientos químico-mecánicos (irrigación/instrumentación). La compleja anatomía del sistema de conductos dificulta la acción de los instrumentos, por lo que la irrigación juega un papel fundamental en la limpieza y desinfección de las zonas no instrumentadas (Haapasalo *et al.*, 2000). Sin embargo, la desinfección de estas áreas es un reto en el tratamiento endodóntico debido a la dificultad que tienen las soluciones irrigadoras para penetrar en ellas. Aunque la activación de las mismas mejora la distribución del irrigante y la limpieza del conducto (Virdee *et al.*, 2018), hasta la fecha ninguno de los métodos empleados reduce significativamente las biopelículas en los istmos y en los conductos radiculares. La solución combinada de NaClO y HEDP ha demostrado una prometedora capacidad antimicrobiana y habilidad de eliminar el barrillo dentinario (Lottanti *et al.*, 2009; Arias-Moliz *et al.*, 2014; Arias-Moliz *et al.*, 2015). Sin embargo, apenas hay información sobre su acción tras la activación por distintos sistemas tanto en el conducto principal como en los istmos.

Por ello, los objetivos de esta Tesis Doctoral fueron:

1. Determinar la actividad antimicrobiana de la mezcla de hipoclorito de sodio y ácido etidróico utilizando diferentes métodos de irrigación que incluyen irrigación convencional, activación ultrasónica y activación con la lima XP-endo Finisher, durante la preparación químico-mecánica, frente a biopelículas microbianas crecidas en conductos radiculares e istmos.
2. Comprobar si hay diferencias en la actividad antibiopelícula utilizando los diferentes métodos de irrigación, en los tercios coronal, medio y apical.



## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1. OBTENCIÓN DE LA RAÍCES MESIALES Y SOLUCIONES IRRIGADORAS

Las raíces mesiales se obtuvieron de molares inferiores humanos extraídos y libres de caries. Éstos se almacenaron en solución de timol al 0,1% a 4°C hasta su uso. El empleo de dientes de origen humano con fines de investigación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Humana de la Universidad de Granada (UGR-438). Los dientes se sometieron a un baño ultrasónico con agua (BRANSONIC® Ultrasonic Cleaner, 5510E-MT, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EEUU) con el objeto de limpiar los restos de tejido periodontal y depósitos mineralizados. Posteriormente se decoronaron cortando a nivel de la unión amelocementaria con una máquina de corte Accuton-50 (Struers, Copenhagen, Dinamarca) a una velocidad de 3.200 rpm e irrigación abundante con agua (**Figura 3.1.**). Una vez decoronados, se cortaron las raíces mesiales y el resto se desechó.

Para confirmar la presencia de istmos, se realizaron tomografías computarizadas de haz cónico (CBCT, Planmeca ProMax 3D; Planmeca, Helsinki, Finlandia) a todas las raíces y se observaron los istmos en las diferentes secciones: axial, sagital y coronal. Las raíces seleccionadas fueron las que presentaban un istmo tipo V bajo la clasificación de Hsu y Kim (Hsu & Kim, 1997), es decir, con una comunicación completa o un corredor entre los dos conductos. Basándose en esta clasificación, se incluyeron especímenes que tenían dos tipos de anatomías de canales radiculares: dos canales radiculares con un istmo continuo desde el tercio cervical al tercio apical (tipo 1); y dos conductos radiculares con un istmo continuo desde el tercio cervical hasta el tercio medio y un conducto en el tercio apical (tipo 2). Un total de cincuenta y seis muestras cumplieron los criterios, 28 de ellos de tipo 1 y 28 de tipo 2.

Las soluciones irrigadoras que se emplearon fueron: NaClO al 2,5% (Panreac Química SA, Castellar del Vallès, España) y HEDP al 9% (Cublen K8514GR; Zschimmer & Schwarz, Mohsdorf, Alemania) en combinación.

Para preparar las combinaciones de NaClO y HEDP, las soluciones se prepararon por separado al doble de su concentración (NaClO al 5%; HEDP al 18%) y posteriormente se mezclaron volúmenes iguales en una proporción 1/1 (volumen/volumen), obteniendo las concentraciones finales antes citadas.



**Figura 3. 1.** Corte de un molar para obtener la raíz mesial con la máquina Accuton-50.

### **3.2. PREPARACIÓN DE LOS CONDUCTOS RADICULARES**

Los conductos radiculares fueron instrumentados con limas K del #15 al #25 (Colorinox, Maillefer SA, Ballaigues, Suiza) y agua destilada como irrigante. Se elaboraron moldes de silicona (ZHERMACK elite® HD+, Rovigo, Italia) de cada raíz con el objetivo de poder manipularlas una vez contaminadas (**Figura 3.2.**). Seguidamente las raíces se seccionaron horizontalmente en tres tercios, coronal, medio y apical (**Figura 3.3.**), empleando un disco de corte de diamante (355514220 HP; Edenta AG, Au, St. Gallen, Suiza) y con la ayuda de un calibre digital (Mahr, MarCal 16EW, Esslingen, Alemania).

La anatomía de los conductos se confirmó nuevamente observando la superficie coronal de cada tercio en una lupa estereoscópica (OLYMPUS, SZ-PT, Japón) (**Figura 3.4.**). El barrillo dentinario formado durante la preparación de las raíces se eliminó sumergiéndolas en EDTA al 17% durante 5 minutos seguido de un lavado con agua destilada en baño de ultrasonido para eliminar los restos de EDTA. A continuación, las raíces divididas en tercios y los moldes de silicona fueron esterilizados en autoclave.



Figura 3.2. Preparación del molde de silicona.

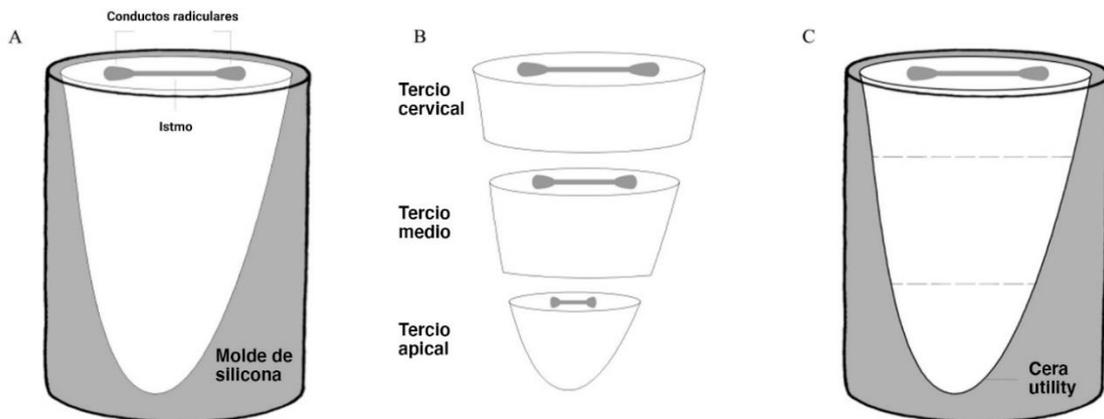


Figura 3.3. Representación esquemática de la preparación de las muestras de tipo 1. **A**, se fabricó un molde de silicona de cada muestra; **B**, las raíces se seccionaron horizontalmente en tres tercios; **C**, los tres tercios se ensamblaron con cera utility y la muestra ensamblada se colocó en el molde de silicona.



**Figura 3.4.** Raíz mesial dividida en tres tercios (coronal, medio y apical, de izquierda a derecha) observada bajo lupa estereoscópica. En los tercios coronal y medio se aprecia istmo que comunica los dos conductos. En el tercio apical hay un único conducto sin istmo.

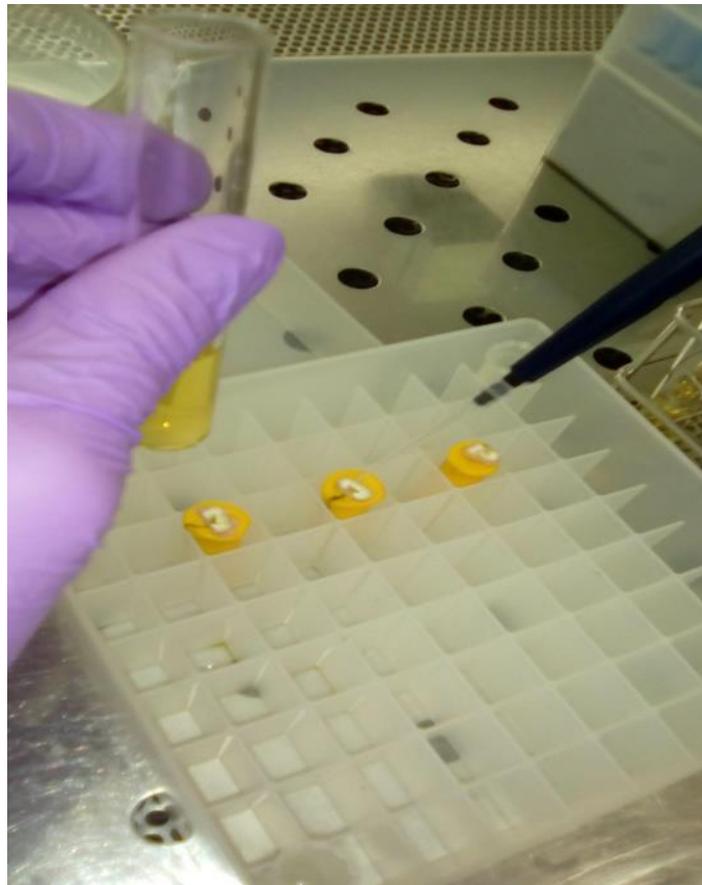
Una vez estériles, todos los procedimientos se realizaron dentro de una cámara de flujo laminar (Telstar, Bio-II-B, Barcelona, España) para evitar contaminaciones. Los tercios se ensamblaron con cera y el ápice también se selló con cera para crear un sistema cerrado y evitar la extrusión del irrigante. Las muestras ensambladas se colocaron en los moldes de silicona.

### 3.3. INFECCIÓN DE LOS CONDUCTOS RADICULARES

Para la contaminación de las muestras se empleó una cepa de *E. faecalis* CECT 795 (Colección Española de Cultivos Tipo, Burjasot, Valencia). Los medios de cultivo que se utilizaron en este estudio fueron BHI (Brain Heart Infusion, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) agar y caldo, en ambos casos suplementados con glucosa al 1,3%. Las bacterias se mantuvieron en tubos en lengüeta con agar BHI suplementado con glucosa a 4°C para su posterior utilización.

Los conductos radiculares se contaminaron con una suspensión de *E. faecalis* de aproximadamente  $10^7$  unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml). Para obtenerla, se realizó una suspensión en caldo BHI ajustada a una densidad óptica 1.0 de la escala de McFarland en un turbidímetro (bioMérieux S.A. France, modelo DensiCHEK™ plus 180330-1, Lyon, Francia). Esta suspensión se diluyó 1/30 en BHI. Para contaminar las raíces se añadieron 10  $\mu$ l de la suspensión bacteriana en el conducto radicular. (**Figura 3.5.**) Las muestras contaminadas se colocaron durante cinco minutos en baño ultrasónico para facilitar la distribución del caldo en el interior del sistema de conductos y posteriormente se incubaron a

37°C durante una semana. Para asegurar la disponibilidad de nutrientes para las bacterias, cada 24 horas se añadieron 10 µl caldo BHI estéril.



**Figura 3.5.** Inoculación de los conductos radiculares con 10 µl de suspensión de *E. faecalis*.

### **3.4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS SOLUCIONES PARA ELIMINAR BIOPELÍCULAS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* CECIDAS EN EL INTERIOR DE LOS CONDUCTOS RADICULARES E ISTMOS**

Una vez crecidas las biopelículas en el interior de los conductos radiculares, 7 raíces de cada tipo (tipo 1 y 2) se distribuyeron al azar en cuatro grupos de estudio: un grupo de control positivo y tres experimentales. Todas las raíces de los grupos experimentales se instrumentaron utilizando las limas rotatorias X1 y X2 del sistema Protaper Next (Dentsly Maillefer, Ballaigues, Suiza) y la solución combinada NaClO al 2,5% y HEDP al 9% como irrigante. Las limas se emplearon hasta la longitud de trabajo, que se estableció a 1 mm menos de la longitud obtenida cuando la lima era visible a través del foramen apical. Cada conducto se irrigó con 3 ml de solución antes de cada lima y después de la última, por un total de 9 ml por conducto. Una vez instrumentados, los conductos se sometieron a los siguientes protocolos de irrigación final:

### **Grupo de irrigación convencional**

La administración con jeringa de un mililitro de la mezcla de NaClO al 2,5% y HEDP al 9% se realizó en cada conducto tres veces durante 30 segundos cada una, con un volumen total de solución irrigadora de 3 ml y un tiempo de 90 segundos. La aguja se insertó a 1 mm de la longitud de trabajo.

### **Grupo de activación ultrasónica**

La activación del irrigante se realizó con un dispositivo de ultrasonido (DTE D7, Guangxi, China) y una punta de ultrasonido Irrisafe #20 (Salettec, Burdeos, Francia) a una potencia de 3 y se colocó a 1 mm de la longitud de trabajo. Un mililitro de la mezcla de NaClO al 2,5% y HEDP al 9% se aplicó en cada conducto durante 10 segundos, y posteriormente se activó durante 20 segundos, con una ligera rotación de la pieza de mano alrededor del eje del conducto. Este ciclo de 30 segundos se repitió tres veces para un volumen total de solución de 3 ml y un tiempo de 90 segundos.

### **Grupo XP-endo Finisher**

La lima se introdujo en el conducto hasta la longitud de trabajo y se activó a 800 rpm y 1-Ncm de torque en un contra-ángulo (Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim, Alemania). Durante la activación se realizaron movimientos lentos ascendentes y descendentes de 7 a 8 mm de longitud para facilitar el contacto con toda la longitud del conducto, tal y como sugiere el fabricante. Un mililitro de la mezcla de NaClO al 2,5% y HEDP al 9% se aplicó en cada conducto durante 10 segundos, tras lo cual la solución se activó durante 20 segundos. Este ciclo de 30 segundos se repitió tres veces, para un volumen total de irrigación de 3 ml y 90 segundos por conducto radicular.

Durante la preparación químico-mecánica, la irrigación se realizó con una aguja de salida lateral de 32 G conectada a una jeringa Luer Lock de 3 ml (Monoject, Covidien, Mansfield, MA, EE.UU.). La aguja se movió hacia adentro y hacia afuera a lo largo del conducto radicular y también a lo largo de su eje, sin exceder la profundidad de inserción deseada, a fin de mejorar la limpieza del conducto y distribuir el irrigante de manera homogénea alrededor de la punta de la aguja (Boutsoukis *et al.*, 2010). Todos estos procedimientos se realizaron dentro de una cámara de flujo laminar (modelo Bio-II-B; Telstar SA, Terrasa, España) y la temperatura se mantuvo a 37 °C mediante un calentador (modelo B-I; Falc Instruments srl, Treviglio, Italia). Una vez preparados, los conductos radiculares se lavaron con 3 ml de tiosulfato de sodio al 5% durante

## MATERIAL Y MÉTODOS

5 minutos para inactivar el NaClO, seguido de 3 ml de solución salina. También se incluyó un grupo de control formado por siete muestras de cada tipo de conducto radicular que se contaminaron pero no se trataron. Posteriormente, las raíces se prepararon para ser observadas al Microscopio Láser Confocal (MLC).

Previo a su observación, las raíces se retiraron de los moldes de silicona y la cera se eliminó. Las muestras se lavaron en solución salina para eliminar los restos de cera. A continuación, los tres tercios de cada raíz se tiñeron con los fluorocromos Syto-9 y ioduro de propidio (IP) (Live/Dead, BacLigth, Invitrogen, Eugene, OR, Estados Unidos) (Netuschil *et al.*, 2014). Ambos fluorocromos tiñen los ácidos nucleicos, discriminando las bacterias viables de las muertas en base a la integridad de la membrana. Los fluorocromos se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante, para lo cual se mezclaron 1 ml de solución salina con 1,5  $\mu$ l de Syto-9 y 1,5  $\mu$ l de IP. Para teñir las muestras, cada una se sumergió en un pocillo de una placa de microtiter con 100  $\mu$ l de la mezcla de los fluorocromos durante 15 minutos en oscuridad. Una vez teñidas, las muestras se lavaron con solución salina y se observaron en el MLC (Leica, modelo TCS-SP5 II, Wetzlar, Alemania) (**Figura 3.6.**). Para ello se montaron en placas 60  $\mu$ -Dish (Ibidi, Martinsried, Alemania) con aceite de montaje (BacLigth, Invitrogen, Eugene, OR, Estados Unidos). Las longitudes de onda de absorción/emisión fueron 494/518 nm para Syto-9 y 536/617 nm para IP.



**Figura 3.6.** Microscopio Laser Confocal Espectral de Alta Velocidad y Multifotón Leica TCS-SP5 II.

De cada tercio se escaneó la superficie coronal. Se obtuvieron al azar dos volúmenes confocales microscópicos por cada ubicación (conducto radicular derecho, conducto radicular izquierdo, e istmo) y tercio (cervical, medio y apical) (Chávez de Paz, 2009). Con el objetivo de seleccionar al azar los volúmenes, el técnico del MLC que no participó en la preparación de la muestra, los seleccionó: de los conductos radiculares, uno en el extremo derecho y otro en el extremo izquierdo de la circunferencia del conducto y en el caso de los istmos, uno en la entrada y otro en el medio del istmo. Se calculó la media de los dos volúmenes escaneados por ubicación-tercio. El número de datos ( $n$ ) por grupo según la ubicación-tercio fue el siguiente y se calculó de la siguiente manera:

- Conducto radicular - tercios cervical y medio ( $n = 28$ ): número de datos del conducto radicular derecho + izquierdo en configuraciones de conducto radicular tipo 1 y 2.
- Conducto radicular - tercio apical ( $n = 21$ ): número de datos del conducto radicular derecho + izquierdo en la configuración tipo 1 + datos del único conducto radicular en apical del tipo 2.
- Istmo - tercios cervical y medio ( $n = 14$ ): número de datos del istmo en las configuraciones tipo 1 y 2.
- Istmo - tercio apical ( $n = 7$ ): número de datos del istmo en la configuración tipo 1.

Los volúmenes escaneados fueron tomados usando un objetivo de inmersión de  $40\times$ ,  $2\ \mu\text{m}$  de step size y un formato de  $512\times 512$  píxeles. Cada imagen representó un área de  $387,5\times 387,5\ \mu\text{m}$ . Para la cuantificación se utilizó el software bioimage\_L (<http://www.bioimage.com>) (Chávez de Paz, 2009). Los parámetros evaluados en cada grupo fueron el biovolumen total y el porcentaje de población roja (células muertas).

### 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó Sample Power 2.0 (IBM Inc., Chicago, IL, USA) para la estimación *post hoc* de la potencia estadística al comparar los cuatro grupos de estudio por parejas. Utilizando la prueba  $t$  para grupos independientes, con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  y una potencia del 80%, las diferencias estandarizadas ( $d$ ) que se pueden detectar son 0,75 cuando  $n = 28$ , 0,9 cuando  $n = 21$ , 1,1 cuando  $n = 14$  y 1,6 cuando  $n = 7$ . La interpretación de  $d$ , según la escala de Cohen (Cohen, 1988) ampliada por Sawilowsky (Sawilowsky, 2009), puede ser la siguiente: mediano (0,5 a 0,8), grande (0,8 a 1,2) y muy grande (1,2 a 2,0).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Tanto para los datos de biovolumen total como para el porcentaje de células muertas, el análisis descriptivo se realizó mediante SPSS 15.0 (SPSS Inc.). Los cálculos de los valores de  $p$  globales se realizaron con el procedimiento REGRESS en SUDAAN 7.0 (RTI, RTP, NC) para ajustar el agrupamiento (múltiples ubicaciones por diente); cuando fue significativo ( $p < 0,05$ ), se procedió a las comparaciones pareadas mediante el procedimiento DESCRIPT en SUDAAN. Este programa informático permitió agrupar múltiples localizaciones por diente. Tiene un diseño factorial completo, con dos factores independientes: localización (conducto radicular e istmo) y tercio (cervical, medio y apical). Se llevó a cabo un análisis estratificado detallado. Los datos originales del biovolumen de la biopelícula no tenían una distribución normal, por lo que se procedió a una transformación logarítmica de base 10. La normalidad (para cada conjunto de datos, localización-tercio y grupo) se comprobó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (resultados no mostrados).



## **4. RESULTADOS**

---



En las **Tablas 4.1. y 4.2.** se muestran los resultados relativos a los biovolúmenes totales de biopelículas en los conductos radiculares e istmos tanto del grupo control como de los grupos expuestos a los diferentes protocolos de irrigación final.

El grupo de control mostró biovolúmenes de biopelícula similares en los tres tercios de los conductos radiculares ( $p = 0,055$ ) e istmos ( $p = 0,616$ ) (**Tablas 4.1. y 4.2.**).

En general, la desinfección de los conductos radiculares mediante los diferentes protocolos de irrigación arrojó valores de biopelícula más bajos que los istmos. El biovolumen en los conductos radiculares se redujo significativamente en todos los grupos experimentales en todos los tercios ( $p < 0,05$ ) excepto en el protocolo que incluyó irrigación convencional en el tercio apical, que no mostró diferencias estadísticas con respecto al grupo control ( $p > 0,05$ ). En los tercios cervical y medio se observó un gradiente de efectividad significativo entre los grupos experimentales, siendo el protocolo con activación ultrasónica el que dio los biovolúmenes más bajos ( $p < 0,05$ ), seguido de XP-endo Finisher. El tercio apical fue el más difícil de desinfectar en comparación con los otros tercios. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en este tercio entre los grupos activados ( $p > 0,05$ ).

La desinfección del istmo varió según el protocolo. El protocolo de irrigación convencional mostró valores intermedios sin diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control o los dos protocolos activados ( $p > 0,05$ ); sin embargo, los dos protocolos activados fueron significativamente diferentes del grupo de control y mostraron valores de biovolumen significativamente menores ( $p < 0,05$ ). No se obtuvieron diferencias significativas entre la activación ultrasónica y XP-endo Finisher en los tercios medio y apical ( $p > 0,05$ ).

Considerando la actividad de los diferentes protocolos por tercio en cada localización, en los conductos radiculares la actividad antimicrobiana fue mayor en los tercios cervical y medio que en el apical, a excepción del protocolo con XP-endo Finisher, el cual no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres tercios ( $p = 0,784$ ). A su vez, en los istmos no se obtuvieron diferencias significativas entre los biovolúmenes de los tres tercios en cada protocolo de irrigación ( $p = 0,396$  para irrigación convencional,  $p = 0,088$  para activación ultrasónica y  $p = 0,489$  para XP-endo Finisher).

**Tabla 4.1.** Biovolumen de biopelícula (Log10) en los conductos radiculares de los distintos tercios tras el tratamiento con los protocolos de irrigación. Media  $\pm$  desviación estándar.

| Localización       | Tercio                 | <i>n</i> | Control positivo               | Irrigación convencional        | Activación ultrasónica         | XP-endo Finisher                 | <i>p</i> -valor global |
|--------------------|------------------------|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Conducto radicular | Cervical               | 28       | 3,61 $\pm$ 0,34 <sup>1.a</sup> | 2,81 $\pm$ 0,99 <sup>2.a</sup> | 2,17 $\pm$ 0,61 <sup>3.a</sup> | 2,59 $\pm$ 0,50 <sup>4.a</sup>   | <0,001                 |
|                    | Medio                  | 28       | 3,82 $\pm$ 0,50 <sup>1.a</sup> | 2,95 $\pm$ 0,96 <sup>2.a</sup> | 2,06 $\pm$ 0,69 <sup>3.a</sup> | 2,49 $\pm$ 0,59 <sup>2.3.a</sup> | <0,001                 |
|                    | Apical                 | 21       | 3,89 $\pm$ 0,64 <sup>1.a</sup> | 3,37 $\pm$ 1,04 <sup>1.b</sup> | 2,53 $\pm$ 0,61 <sup>2.b</sup> | 2,56 $\pm$ 0,72 <sup>2.a</sup>   | <0,001                 |
|                    | <i>p</i> -valor global |          | 0,055                          | 0,017                          | 0,012                          | 0,784                            |                        |

Leídas verticalmente, las mismas letras muestran diferencias que no son estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en cada grupo entre tercios, en el conducto radicular. Leídos horizontalmente, los mismos números muestran diferencias que no son estadísticamente significativas entre los grupos.

Los cálculos del valor de *p* global se realizaron con el procedimiento REGRESS en SUDAAN para ajustar el agrupamiento (múltiples ubicaciones por diente); si fue significativo ( $p < 0.05$ ), se procedió a las comparaciones pareadas mediante el procedimiento DESCRIPT en SUDAAN.

*n*, número de datos/grupo según la ubicación-tercio de la siguiente manera:

Conducto radicular - cervical y medio: datos del conducto radicular derecho + izquierdo en configuraciones de conducto radicular tipo 1 y 2.

Conducto radicular - apical: datos del conducto radicular derecho + izquierdo en el tipo 1 + los únicos datos del conducto radicular en el tipo 2.

**Tabla 4.2.** Biovolumen de biopelícula (Log10) en los istmos de los distintos tercios tras el tratamiento con los protocolos de irrigación. Media  $\pm$  desviación estándar.

| Localización Tercio | <i>n</i>               | Control positivo | Irrigación convencional        | Activación ultrasónica             | XP-endo Finisher               | <i>p</i> -valor global         |        |
|---------------------|------------------------|------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| Istmo               | Cervical               | 14               | 3,64 $\pm$ 0,43 <sup>1.a</sup> | 3,06 $\pm$ 1,02 <sup>1,2,3.a</sup> | 2,49 $\pm$ 0,72 <sup>2.a</sup> | 3,13 $\pm$ 0,37 <sup>3.a</sup> | <0,001 |
|                     | Medio                  | 14               | 3,74 $\pm$ 0,29 <sup>1.a</sup> | 3,39 $\pm$ 0,99 <sup>1.2a</sup>    | 2,91 $\pm$ 0,66 <sup>2.a</sup> | 3,28 $\pm$ 0,65 <sup>2.a</sup> | <0,001 |
|                     | Apical                 | 7                | 3,77 $\pm$ 0,33 <sup>1.a</sup> | 3,44 $\pm$ 0,93 <sup>1.2a</sup>    | 2,94 $\pm$ 0,83 <sup>2.a</sup> | 3,07 $\pm$ 0,83 <sup>2.a</sup> | 0,020  |
|                     | <i>p</i> -valor global |                  | 0,616                          | 0,396                              | 0,088                          | 0,489                          |        |

Leídas verticalmente, las mismas letras muestran diferencias que no son estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en cada grupo entre tercios en el istmo. Leídos horizontalmente, los mismos números muestran diferencias que no son estadísticamente significativas entre los grupos.

Los cálculos del valor de *p* global se realizaron con el procedimiento REGRESS en SUDAAN para ajustar el agrupamiento (múltiples ubicaciones por diente); si fue significativo ( $p < 0.05$ ), se procedió a las comparaciones pareadas mediante el procedimiento DESCRIPT en SUDAAN.

*n*, número de datos/grupo según la ubicación-tercio de la siguiente manera:

Istmo - cervical y medio: datos del istmo en tipo 1 y 2.

Istmo - apical: datos del istmo en tipo 1.

En relación a los porcentajes de células muertas, éstos fueron similares para todos los grupos (incluido el grupo control) en los tres tercios, tanto en los conductos radiculares e istmos (**Tablas 4.3. y 4.4.**). Tan sólo se encontraron diferencias significativas en el tercio cervical del grupo XP-endo Finisher, que fue significativamente menor que en los tercios cervicales de los otros grupos, tanto en el conducto radicular como en el istmo ( $p < 0,001$ ). De igual forma, el tercio apical del grupo control en el istmo presentó un porcentaje de células muertas menor que el resto de los tercios ( $p = 0,012$ ).

**Tabla 4.3.** Porcentaje de bacterias muertas en los conductos radiculares de los distintos tercios tras el tratamiento con los protocolos de irrigación. Media  $\pm$  desviación estándar.

| Localización       | Tercio         | n  | Control positivo             | Irrigación convencional      | Activación ultrasónica       | XP-endo Finisher             | p-valor global |
|--------------------|----------------|----|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------|
| Conducto radicular | Cervical       | 28 | 22,7 $\pm$ 15,5 <sup>1</sup> | 27,5 $\pm$ 13,4 <sup>1</sup> | 29,3 $\pm$ 13,8 <sup>1</sup> | 11,6 $\pm$ 12,7 <sup>2</sup> | <0,001         |
|                    | Medio          | 28 | 19,0 $\pm$ 17,7              | 26,5 $\pm$ 24,6              | 26,2 $\pm$ 22,0              | 19,3 $\pm$ 23,9              | 0,548          |
|                    | Apical         | 21 | 16,2 $\pm$ 14,7              | 20,6 $\pm$ 20,9              | 24,9 $\pm$ 29,1              | 10,1 $\pm$ 11,7              | 0,157          |
|                    | p-valor global |    | 0,245                        | 0,361                        | 0,829                        | 0,238                        |                |

Leído horizontalmente, los mismos números muestran diferencias que no son estadísticamente significativas entre grupos.

Valores de p globales se realizaron con el procedimiento REGRESS en SUDAAN 7.0 y las comparaciones pareadas DESCRIPT en SUDAAN.

n: número de muestras por tercio y localización.

**Tabla 4.4.** Porcentaje de bacterias muertas en los istmos de los distintos tercios tras el tratamiento con los protocolos de irrigación. Media  $\pm$  desviación estándar.

| Localización | Tercio         | n  | Control positivo               | Irrigación convencional      | Activación ultrasónica       | XP-endo Finisher           | p-valor global |
|--------------|----------------|----|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------|
| Istmo        | Cervical       | 14 | 24,0 $\pm$ 21,9 <sup>1,a</sup> | 27,9 $\pm$ 11,7 <sup>1</sup> | 27,9 $\pm$ 22,2 <sup>1</sup> | 8,2 $\pm$ 8,1 <sup>2</sup> | <0,001         |
|              | Medio          | 14 | 20,0 $\pm$ 18,2 <sup>a</sup>   | 27,9 $\pm$ 27,4              | 27,2 $\pm$ 17,3              | 11,6 $\pm$ 16,3            | 0,063          |
|              | Apical         | 7  | 9,8 $\pm$ 8,3 <sup>b</sup>     | 18,6 $\pm$ 21,6              | 20,1 $\pm$ 37,1              | 13,7 $\pm$ 15,5            | 0,627          |
|              | p-valor global |    | 0,012                          | 0,459                        | 0,784                        | 0,441                      |                |

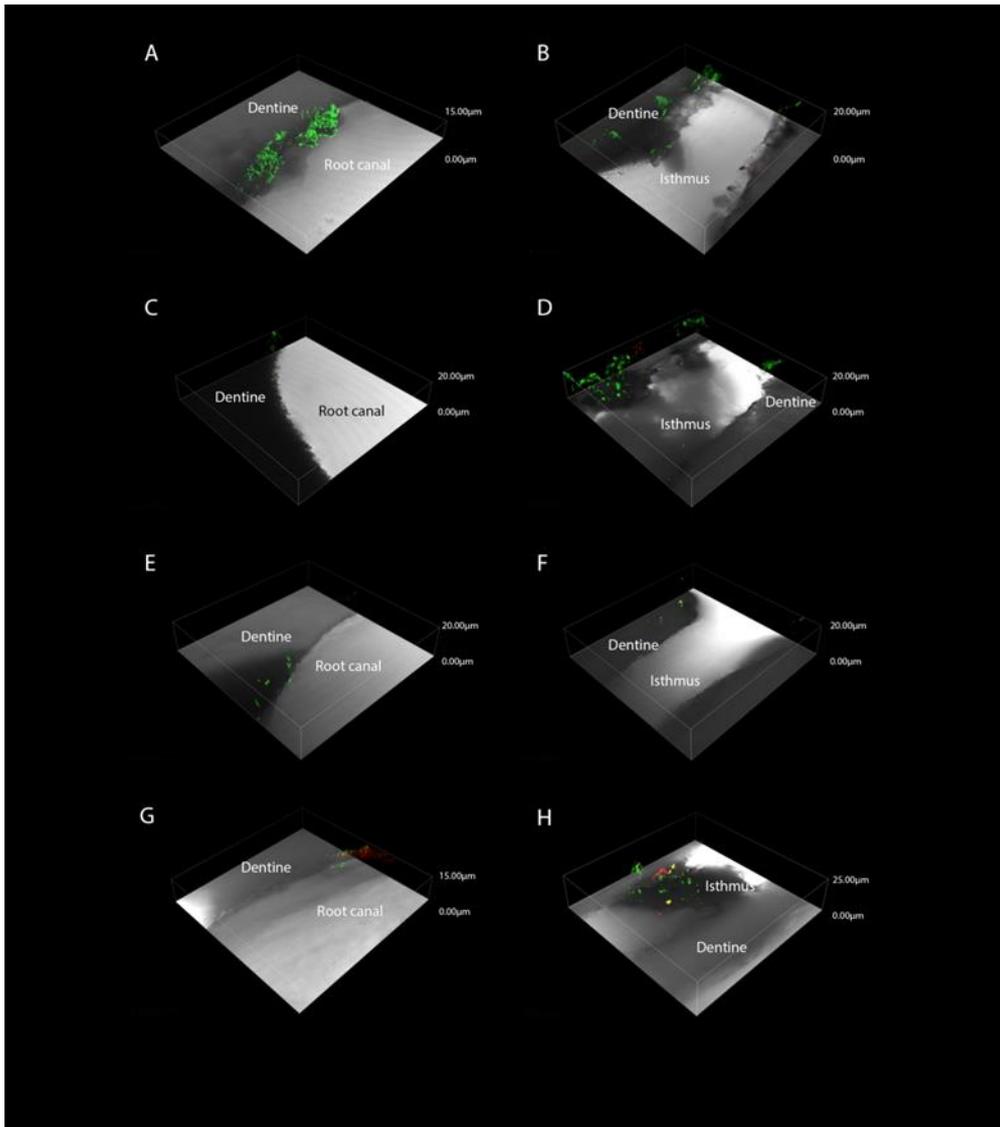
Leído verticalmente, las mismas letras muestran diferencias que no son estadísticamente significativas en cada grupo entre tercios,

Leído horizontalmente, los mismos números muestran diferencias que no son estadísticamente significativas entre grupos,

Valores de p globales se realizaron con el procedimiento REGRESS en SUDAAN 7,0 y las comparaciones pareadas DESCRIPT en SUDAAN,

n: número de muestras por tercio y localización.

En la **Figura 4.1.** se muestran imágenes de MLC representativas de los conductos radiculares e istmos del tercio apical tratados con los diferentes protocolos de irrigación.



**Figura 4.1.** Imágenes del Microscopio Láser Confocal (MLC) de la desinfección del tercio apical a nivel del conducto radicular y del istmo mediante diferentes protocolos de irrigación con la combinación de NaClO y HEDP. **A**, conducto radicular contaminado (grupo control); **B**, istmo contaminado (grupo control); **C**, conducto radicular tratado con protocolo de irrigación convencional; **D**, istmo tratado con protocolo de irrigación convencional; **E**, conducto radicular después de activar la solución con ultrasonidos; **F**, istmo después de activar la solución con ultrasonidos; **G**, conducto radicular después de activar la solución con XP-endo Finisher; **H**, istmo después de activar la solución con XP-endo Finisher.



## **5. DISCUSIÓN**

---



## 5.1. JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA

En este estudio se ha empleado la bacteria *E. faecalis* por estar altamente implicada en las infecciones endodónticas persistentes, en ocasiones en monoinfección (Engström B, 1964; Sundqvist *et al.*, 1998; Molander *et al.*, 1998; Rôças *et al.*, 2004). Esto es debido entre otros motivos, a que presenta una amplia variedad de polimorfismos genéticos (Sedgley *et al.*, 2004), produce proteínas que le ayudan a adherirse a la dentina (Hubble *et al.*, 2003), es capaz de sobrevivir periodos largos de escasez de nutrientes utilizando el suero como fuente de alimento (Figdor *et al.*, 2003) y resiste la medicación intraconducto con hidróxido de calcio (Haapasalo & Orstavik, 1987; Orstavik & Haapasalo, 1990; Evans *et al.*, 2002). *E. faecalis* se aísla tanto en las paredes del sistema de conductos radiculares como en el interior de los túbulos dentinarios, siendo capaz de penetrar una profundidad de 300-400  $\mu\text{m}$  (Orstavik & Haapasalo, 1990).

Se seleccionaron las raíces mesiales de los molares mandibulares humanos debido a que éstas presentan una alta incidencia de istmo que va del 54% al 100% (de Pablo *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2013; Karunakaran *et al.*, 2019). La frecuencia de istmo en estas raíces disminuye a medida que avanzamos hacia el tercio apical (Karunakaran *et al.*, 2019). Este es el motivo por el que se incluyeron raíces con un istmo que conecta toda la longitud de los dos canales principales (tipo 1), así como raíces con istmos solo en los tercios cervical y medio (tipo 2). Por ello, el número de datos obtenidos del istmo del tercio apical es la mitad que el de los otros tercios, 7 frente a 14 por grupo.

Las raíces se cortaron en tercios antes de ser contaminadas por dos razones. En primer lugar, para confirmar la presencia de istmos mediante un microscopio estereoscópico. Pevio a la sección por tercios, los istmos se identificaron por CBCT (Estrela *et al.*, 2015; Neelakantan *et al.*, 2016). Sin embargo, las imágenes de CBCT han mostrado una sensibilidad limitada (65%-75%) en la detección de istmos apicales en las raíces mesiales de los primeros molares inferiores (Tolentino *et al.*, 2018; Tolentino *et al.*, 2020). Este es el motivo por el que se decidió confirmar su presencia mediante microscopio. En segundo lugar, las raíces se cortaron para evitar seccionar las muestras después de los protocolos de irrigación, ya que hacerlo podría alterar la muestra por la acción del disco de diamante y la capa de barrillo producido y, consecuentemente, alterar la evaluación mediante MLC.

La combinación de NaClO y HEDP fue elegida como solución de irrigación única durante la preparación químico-mecánica del conducto radicular. Esta solución induce una quelación

continúa que previene o reduce la formación de barrillo dentinario y detritus de dentina en áreas de difícil acceso, de forma similar al protocolo de irrigación de NaClO seguido por EDTA (Lottanti *et al.*, 2009; Paqué *et al.*, 2012). También exhibe una buena capacidad de disolución de materia orgánica (Tartari *et al.*, 2015; Tejada *et al.*, 2019) y actividad antimicrobiana frente a las biopelículas de la superficie de la dentina y en el interior de los túbulos dentinarios (Arias-Moliz *et al.*, 2014; Arias-Moliz *et al.*, 2015; Morago *et al.*, 2019). La solución combinada ha demostrado ser igual de efectiva en la desinfección de dentina infectada durante la preparación químico-mecánica que el protocolo de NaClO seguido de EDTA (Morago *et al.*, 2019). Esta actividad mejora cuando se activa mediante diferentes métodos que incluyen la activación ultrasónica (Neelakantan *et al.*, 2015).

Los protocolos de irrigación final fueron 3, irrigación convencional con jeringa sin activar, activación con lima ultrasónica y activación con lima XP-endo Finisher. La irrigación convencional consiste en distribuir un irrigante en el interior del sistema de conductos a través de agujas de calibres variables, lo cual genera un movimiento de fluidos que tiene una acción de enjuague y puede desalojar desechos y microorganismos de las paredes del conducto radicular hacia la superficie coronal, al tiempo que evita la extrusión de éste hacia los tejidos periapicales. Sin embargo, este método a menudo no logra administrar y distribuir las soluciones de irrigación de manera adecuada dentro del complejo sistema de conductos radiculares, especialmente en el tercio apical y los istmos (Thomas *et al.*, 2014; Deleu *et al.*, 2015; Versiani *et al.*, 2015). Por lo tanto, es probable que estas áreas inaccesibles del sistema de conductos alberguen desechos y bacterias. De igual manera el efecto burbuja de aire o efecto “vapor lock” que se produce puede interferir en el movimiento del irrigante en el interior del conducto, lo que dificulta el desbridamiento completo del sistema de conductos (Wu & Wesselink, 2001; Nair *et al.*, 2005; Wu Mk *et al.*, 2006; Tay FR *et al.*, 2010). Para superar esta limitación, se emplearon métodos de activación complementaria como son la irrigación ultrasónica pasiva (IUP) y la agitación del irrigante mediante lima XP-endo Finisher.

Durante la IUP, la energía se transmite desde un instrumento oscilante al irrigante en el interior del conducto radicular mediante ondas ultrasónicas. Esta transmisión acústica causa la desaglomeración de las biopelículas bacterianas dentro del conducto radicular, pudiendo así provocar que las bacterias planctónicas resultantes sean más susceptibles a la actividad bactericida de NaClO (Joyce *et al.*, 2003). La cavitación por otro lado, puede producir un debilitamiento temporal de la membrana celular, haciendo que las bacterias sean más

permeables al NaClO. La IUP también puede provocar un aumento en la temperatura del irrigante, lo que se traduce en el aumento de la concentración de cloro disponible, resultando en una disolución mayor de colágeno (Frais & Gulabivala, 2001; Woodmansey KF, 2005; Dumitriu & Dobre, 2015).

Por último, se seleccionó la lima XP-endo Finisher como último paso en la desinfección de conductos debido a que su diseño y composición permiten desbridar las biopelículas de las paredes del conducto radicular así como distribuir la solución irrigadora de un forma más eficiente (Paiva *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2017; Debelian & Trope, 2015). A temperatura ambiente, este instrumento adopta una forma lineal, pero a temperatura corporal cambia su conformación a una forma de cuchara (Debelian & Trope, 2015). Dicha forma hace que el instrumento se expanda y se contraiga para tocar las paredes del conducto y agitar la solución irrigadora (Paiva *et al.*, 2013; Debelian & Trope, 2015), pudiendo de esta manera ayudar a eliminar las biopelículas de áreas anatómicas de difícil acceso (Bao *et al.*, 2017).

Tanto en la activación con IUP como con lima XP-endo Finisher se realizó el protocolo de tres activaciones de solución de irrigación durante 20 segundos en lugar de irrigación y activación continua, ya que facilita la renovación de la solución y proporciona una mejor limpieza del tercio apical del conducto y del istmo (van der Sluis *et al.*, 2010; Duque *et al.*, 2017; Chan *et al.*, 2019).

Para el estudio de la actividad antimicrobiana se empleó el microscopio láser confocal junto con fluorocromos de viabilidad, que permite la visualización, cuantificación y el estudio de la viabilidad de las bacterias en función del estado de su membrana. La microscopía láser confocal es una técnica microscópica de fluorescencia que presenta grandes ventajas frente a la microscopía óptica tradicional. Entre ellas destacan una mayor resolución, la posibilidad de realizar secciones ópticas (el sistema es capaz de tomar imágenes a diferente profundidad en el eje z), ofrece un mayor contraste debido a que elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco, permite la reconstrucción 3D de las estructuras a partir de las secciones ópticas y facilita el análisis de las imágenes obtenidas mediante diferentes softwares (Martínez-Nístal *et al.*, 1995).

Para la visualización de los microorganismos en este microscopio se emplearon los fluorocromos Syto-9 y IP, del kit de viabilidad Live/Dead. Ambos tiñen los ácidos nucleicos discriminando las células viables de las muertas en base a la integridad de la membrana. Syto-9 es una molécula pequeña que atraviesa las membranas permeables y, cuando es excitada, emite una fluorescencia verde. IP es una molécula que es impermeable a la membrana y no atraviesa las

membranas intactas, por lo que solo se fija al ADN de bacterias con membranas dañadas, emitiendo una fluorescencia roja al ser excitado. Por otro lado, IP tiene más afinidad por los ácidos nucleicos que Syto-9 y, por ello, cuando ambos fluorocromos están presentes en una célula, Syto-9 es desplazado de los ácidos nucleicos por IP y la célula se tiñe con IP (Molecular probes: Product information LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability Kit. 2004, Boulos *et al.*, 1999).

El empleo de los fluorocromos unidos a la microscopía confocal permite el análisis *in situ* de las biopelículas sin alterar su estructura. Con esta técnica, en este estudio hemos evaluado dos parámetros, la viabilidad y el biovolumen de células unidas a la dentina (Shen *et al.*, 2010; Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2014). Hay que resaltar el interés en conocer los cambios en el biovolumen tras el tratamiento con NaClO, el cual es un desorganizador de materia orgánica, incluyendo las biopelículas.

A pesar de las ventajas, esta técnica tiene ciertas limitaciones. La más importante hace referencia a los falsos negativos que se obtienen con aquellas bacterias que tienen membranas dañadas pero que pueden reanimarse si las condiciones del medio vuelven a ser favorables (Shen *et al.*, 2010). Estas células se tiñen de rojo debido a alteración de la integridad de sus membranas (Kaprelyants & Kell, 1992; Kaprelyants *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 2007). A pesar de esta desventaja, el análisis de al menos dos parámetros, biovolumen total y porcentaje de células con membranas dañadas (muertas), permite obtener una mejor comprensión de la actividad antimicrobiana de las soluciones. Aunque la denominación correcta es células con membranas dañadas, en este trabajo se ha utilizado el término células muertas.

Finalmente, para el análisis de las imágenes obtenidas en el MLC, se ha empleado el software *bioImage\_L* (Chávez de Paz, 2009).

## **5.2. ESTUDIO DE LA DESINFECCIÓN DE CONDUCTOS RADICULARES E ISTMOS MEDIANTE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN**

Este estudio evaluó la actividad antimicrobiana de tres protocolos de irrigación diferentes tanto en conductos radiculares como en istmos. Los resultados mostraron que los protocolos que incluyeron los métodos de activación ultrasónica y XP-endo Finisher, mostraron una mayor actividad antimicrobiana que la irrigación convencional en los conductos radiculares. Esto no ocurrió en los istmos, donde esta actividad fue similar para todos los grupos experimentales del

estudio. Ninguno de los sistemas de activación fue capaz de dejar libres de bacterias tanto los istmos como los conductos radiculares en el tercio apical.

En el grupo de control, los niveles de contaminación dentro de los conductos radiculares y los istmos en los tres tercios no presentaron diferencias significativas, y las desviaciones estándar no fueron muy altas, lo que indica que el método de contaminación es válido.

En general, la reducción del biovolumen de las biopelículas en los conductos radiculares fue mayor que en los istmos. Concretamente, la desinfección en los conductos radiculares fue mejor en los tercios cervical y medio que en el tercio apical. El protocolo de irrigación convencional mostró los volúmenes más altos de biopelícula residual en estos dos tercios coronales en comparación con los otros grupos de estudio, aunque mostró una reducción significativa con respecto al grupo de control, lo que indica su capacidad para distribuir el irrigante de manera adecuada en la luz del conducto (Brito *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2012). Sin embargo, teniendo en cuenta que la aguja se colocó a 1 mm de la longitud de trabajo y que la solución generalmente puede penetrar hasta 1 mm más apical de la punta de la aguja, la limitada actividad en el tercio apical puede explicarse por la dificultad de la solución para entrar en contacto con la biopelícula bacteriana dentro de esta ubicación. Por este motivo, la activación de las soluciones irrigadoras parece ser necesaria para el proceso de desinfección, a fin de potenciar el contacto de las soluciones con las paredes de la dentina y optimizar la limpieza de toda la longitud del conducto.

Los protocolos que incluyeron la activación del irrigante lograron una mayor reducción de la biopelícula bacteriana en los conductos radiculares. En general, la activación ultrasónica obtuvo mayores porcentajes de reducción que XP-endo Finisher, aunque no se observaron diferencias en los tercios medio y apical en los dos protocolos. A pesar de que se ha demostrado una actividad antimicrobiana significativa con la activación ultrasónica en el conducto principal (Neelakantan *et al.*, 2015), los estudios que comparan ambos protocolos de activación apuntan hallazgos algo controvertidos. Mientras que un estudio reportó una mayor desinfección empleando el ultrasonido (Sasanakul *et al.*, 2019), otro observó una actividad similar de ambos métodos de activación (Alves *et al.*, 2016), y un tercero informó una mayor efectividad con XP-endo Finisher que con ultrasonido (Bao *et al.*, 2017). Estas diferencias pueden explicarse por los diversos diseños experimentales en los diferentes trabajos, así como por el tipo y toma de muestra, la evaluación microbiológica, el tipo y volumen de solución de irrigadora, el protocolo de activación y la anatomía del conducto radicular. Sin embargo, en general, y de acuerdo con nuestros resultados, las diferencias encontradas entre los dos métodos de activación en las

paredes del conducto radicular fueron menores, especialmente en los tercios medio y apical (Bao *et al.*, 2017; Sasanakul *et al.*, 2019), lo que pone de manifiesto la capacidad de ambos protocolos para lograr una mejor desinfección en áreas de fácil acceso.

Por lo que respecta al istmo, en general éste fue más difícil de desinfectar que las paredes del conducto radicular. La irrigación convencional no logró reducir la biopelícula dentro de toda esta localización, mostrando una capacidad limitada para distribuir la solución en áreas de difícil acceso, como se demostró previamente por diversos estudios (Thomas *et al.*, 2014; Versiani *et al.*, 2015; Deleu *et al.*, 2015; Pacheco-Yanes *et al.*, 2019). La reducción de la biopelícula en el istmo fue ligeramente mayor con los dos protocolos de activación, dando valores similares en los tres tercios. Sin embargo, ésta no mostró diferencias significativas con respecto a la irrigación convencional. Estos resultados indican que la acción física proporcionada por el diseño y el movimiento helicoidal de la lima XP-endo Finisher, así como la transmisión acústica y la cavitación producida por la punta ultrasónica, pueden haber favorecido que el irrigante alcance áreas previamente intactas y desplace parte de las biopelículas bacterianas (Debelian & Trope 2015; Yasui 2018; Căpută *et al.*, 2019). Aun así, aunque estos grupos activados redujeron significativamente la biopelícula dentro del istmo en comparación con el control, la reducción no fue significativa con respecto al grupo de irrigación convencional; es decir, su efectividad fue limitada.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los del único estudio que evaluó la actividad antimicrobiana de la activación ultrasónica y la lima XP-endo Finisher en el istmo y las áreas de difícil acceso de los molares mandibulares (Alves *et al.*, 2016). Puede ser que el flujo de irrigante generado por la aguja o por la agitación por medios mecánicos y ultrasónicos, no sea suficiente para mejorar la penetración y llenado de la zona del istmo (Pacheco-Yanes *et al.*, 2019). Por otro lado, la turbulencia producida por los sistemas de activación dentro del conducto radicular podría favorecer la acumulación de detritus y bacterias, dificultando el acceso de la solución irrigadora a áreas de difícil acceso (Hsieh *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; Al-Ali *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta los resultados sobre la ausencia de diferencias en la desinfección de los istmos entre los tres protocolos de irrigación, la mayor efectividad de los grupos activados con respecto a la irrigación convencional en los conductos radiculares podría explicarse por la acción física de la punta ultrasónica y la XP-endo Finisher en las paredes del conducto radicular, lo cual podría haber ayudado a eliminar las biopelículas bacterianas de manera más eficaz. No existe

## DISCUSIÓN

consenso en la literatura con respecto a la actividad antimicrobiana de la irrigación convencional en contraposición a la activación ultrasónica. Revisiones recientes (Căpută *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019) informan que un gran porcentaje de los estudios de laboratorio encontraron un efecto antimicrobiano superior con la irrigación ultrasónica pero los ensayos clínicos no detectaron una mayor reducción de la carga microbiana o aumento del éxito clínico mediante la activación ultrasónica en comparación con la irrigación convencional. Además, es importante tener en cuenta que la acción física de la activación ultrasónica depende de las condiciones locales de aplicación, como el tamaño de la punta de ultrasonido, las propiedades de la superficie de la punta, la geometría del conducto radicular y la dirección de la oscilación (Ahmad *et al.*, 1988; Roy *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 2010). De hecho, la oscilación de la lima hacia la irregularidad del conducto radicular limpia los desechos de esta ubicación de manera más efectiva (Jiang *et al.*, 2010). Por lo tanto, la ligera rotación de la pieza de mano ultrasónica realizada en este estudio durante su aplicación puede haber influido en la baja actividad dentro de los istmos, por lo que se podría esperar una mayor efectividad si la oscilación de la lima se dirige hacia el istmo. Por otra parte, la acción química de la solución podría ser aún más relevante que la acción física (De Meyer *et al.*, 2017), lo que explicaría las leves diferencias que observamos entre el grupo de irrigación convencional y los grupos activados.

La mayor dificultad para desinfectar el tercio apical de los conductos radiculares e istmos encontrados en este estudio podría extrapolarse en general a la anatomía irregular presente en este tercio. De hecho, ningún sistema de activación, penetra y elimina las biopelículas dentro de las irregularidades anatómicas del sistema de conductos (particularmente en el tercio apical), aunque estos sistemas de activación, IUP y la lima XP-endo Finisher son los más efectivos en general (de Gregorio *et al.*, 2010; Spoorthy *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2017; Mohammed *et al.*, 2018). Esto sugiere que su uso como método de irrigación complementario podría mejorar la desinfección de las irregularidades anatómicas del tercio apical.

En este estudio, el MLC ayudó a evaluar *in situ* la viabilidad, ubicación y distribución de las biopelículas bacterianas dentro del sistema de conductos radiculares, una contribución novedosa especialmente por los istmos. En cuanto a la viabilidad de las bacterias residuales, ninguno de los protocolos de irrigación fue eficaz para matar las bacterias en las paredes del conducto radicular y los istmos; los bajos porcentajes de muerte en los diferentes grupos de estudio fueron similares a los del grupo control. Tan sólo se encontraron diferencias significativas en el tercio cervical del grupo XP-endo Finisher que mostró porcentajes de muerte menores que

los otros grupos, tanto en el conducto radicular como en el istmo. Esta falta de acción antimicrobiana obtenida en general, en gran parte inesperada, puede no ser muy relevante, ya que refleja la viabilidad bacteriana solo del biovolumen residual que ya está reducido.

Los resultados obtenidos deben considerarse con cierta cautela, porque la anatomía del conducto radicular puede variar entre muestras, lo que podría influir en los resultados. No obstante, el hecho de que los parámetros experimentales fueron estandarizados y controlados, incluyendo la solución irrigadora, volumen, temperatura, tiempo de activación, tipo de aguja y profundidad de colocación de la aguja, da rigor a los hallazgos obtenidos. Finalmente, para confirmar los resultados se necesitan más estudios con sistemas de conductos estandarizados que evalúen el comportamiento de los protocolos de irrigación dentro de los istmos y que también incluyan soluciones convencionales como NaClO y EDTA.

## **CONCLUSIONES**



**PRIMERA:** En los conductos radiculares, la activación ultrasónica y con la lima XP-endo Finisher de la solución combinada de NaClO y HEDP mostró una mayor eficacia que la irrigación convencional. En los istmos, no se observaron diferencias entre los dos métodos de activación y la irrigación convencional.

**SEGUNDA:** En relación a los tercios, el tercio apical de los conductos radiculares fue el más difícil de desinfectar en comparación con los otros tercios, siendo la irrigación convencional con la solución combinada de NaClO y HEDP el método menos efectivo. En los istmos, ninguno de los métodos de activación consiguió reducir las biopelículas microbianas en los tres tercios.



## **CONCLUSIONS**



**FIRST:** In root canals, ultrasonic and XP-endo Finisher activation of the combined solution of NaOCl and HEBP showed a higher efficacy than conventional irrigation. In the isthmuses, no differences were observed between the two activation methods and conventional irrigation.

**SECOND:** In relation to the thirds, the apical third of the root canals was the most difficult to disinfect compared to the other thirds, with conventional irrigation with the combined solution of NaOCl and HEBP being the least effective method. In the isthmuses, none of the activation methods succeeded in reducing microbial biofilms in all three thirds.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Adcock, JM., Sidow, SJ., Looney, SW., Liu, Y., McNally, K., Lindsey, K., & Tay, FR.** (2011): "Histologic evaluation of canal and isthmus debridement efficacies of two different irrigant delivery techniques in a closed system", *J Endod*, 37(4), pp.544-548.
- Ahmad, M., Pitt Ford, TR., & Crum, LA.** (1987): "Ultrasonic debridement of root canals: an insight into the mechanisms involved", *J Endod*, 13(3), pp.93-101.
- Ahmad, M., Pitt Ford, TJ., & Crum, LA.** (1987): "Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role", *J Endod*, 13(10), pp.490-499.
- Ahmad, M., Pitt Ford TR., Crum, LA., & Walton, AJ.** (1988): "Ultrasonic debridement of root canals: acoustic cavitation and its relevance", *J Endod*, 14(10), pp.486-493.
- Ahmad, M., Pitt, Ford TR., Crum, LA., Walton, AJ.** (1988): "Ultrasonic debridement of root canals: acoustic cavitation and its relevance", *J Endod*, 14, pp.486-493.
- Al-Ahmad, A., Maier, J., Follo, M., Spitzmüller. B., Wittmer, A., Hellwig, E., Hübner, J., & Jonas, D.** (2010): "Food-borne enterococci integrate into oral biofilm: an in vivo study", *J Endod.*, 36, pp.1812-1819.
- Al-Ali, M., Sathorn, C., & Parashos, P.** (2012): "Root canal debridement efficacy of different final irrigation protocols", *Int Endod J*, 45, pp.898-906.
- Álvarez-Sagües, A., Herce, N., Amador, U., Llinares-Pine, I F., Nistal-Villan, E., Presa, J, Álvarez, L., & Azabal, M.** (2021): "Efficacy of EDTA and HEDP Chelators in the Removal of Mature Biofilm of *Enterococcus faecalis* by PUI and XPF File Activation", *Dent J (Basel)*,9(4), pp.41.
- Alves Flávio, FR., Almeida, BM., Neves, MA., Moreno, JO., Rôças, IN., Siqueira, JF Jr.** (2011): "Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches", *J Endod*, 37(4), pp.496-501.
- Alves Flávio, RF., Andrade-Junior, CV., Marceliano- Alves, MF., Pérez, AR., Rôças, IN., Versiani, MA., Sousa-Neto, MD., Provenzano, JC., & Siqueira Jr, JF.** (2016): "Adjunctive steps for disinfection on the mandibular molar root canal system: a correlative bacteriologic micro-computed tomography, and criopulverization approach", *J Endod*, 42(11), pp.1667-1672.
- Arias-Moliz, MT., Ordinola-Zapata, R., Baca, P., Ruiz-Linares, M., & Ferrer-Luque, CM.** (2014): "Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution", *J Endod*, 40(12), pp.1999-2002.
- Arias-Moliz, MT., Ordinola-Zapata, R., Baca, P., Ruiz-Linares, M., García García, E., Duarte, H., & Ferrer-Luque, CM.** (2015): "Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms", *Int Endod J*, 48 (12), pp.1188-1193.
- Arias-Moliz, MT., Morago, A., Ordinola-Zapata, R., Ferrer-Luque, CM., Ruiz-Linares, M., & Baca, P.** (2016): "Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid", *J Endod*,42(5), pp.771-775.

- Azim, AA., Aksel, H., Zhuang, T., Mashtare, T., Babu, JP., & Huang, GT.** (2016): "Efficacy of 4 irrigation protocols in killing bacteria colonized in dentinal tubules examined by a novel confocal laser scanning microscope analysis", *J Endod*, 42(6), pp.928-934
- Bahcall, J., & Oslen, FK.** (2007): "Clinical introduction of a plastic rotary endodontic finishing file", *Endo Prac.*, 10(5), pp.17-20.
- Ballal, NV., Das, S., Rao, BSS., Zehnder, M., & Mohn, D.** (2019a): "Chemical, cytotoxic and genotoxic analysis of etidronate in sodium hypochlorite solution", *Int Endod J*, 2 52(8), pp.1228-1234.
- Ballal, NV., Gandhi, P., Shenoy, PA., Shenoy Belle, V., Bhat, V., Rechenberg, DK., & Zehnder, M.** (2019b): "Safety assessment of an etidronate in a sodium hypochlorite solution: randomized double-blind trial", *Int Endod J*, 52(9), pp.1274-1282.
- Bao, P., Shen, Y., Lin, J., & Haapasalo, M.** (2017): "In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals", *J Endod*, 43(2), pp.321-325.
- Bergenholtz, G.** (1974): "Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth", *Odontol Revy*, 25(4), pp.347-58.
- Bjarnsholt, T.** (2013): "The role of bacterial biofilms in chronic infections", *APMIS Supplementum*, 121, pp.604-651.
- Brennen, CE.** (1995): "Cavitation and bubble dynamics", *Oxford University Press*.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., & Desjardins, R.** (1999): "LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water", *Journal Microbiol Methods*, 37(1), pp.77-86.
- Bouillaguet, S., Manoil, D., Girard, M., Louis, J., Gaïa, N., Leo, S., Schrenzel, J., Lazarevic, V.** (2018): "Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis", *Front Microbiol*, 9, 2374.
- Boutsioukis, C., Lambrianidis, T., Verhaagen, B., Versluis, M., Kastrinakis, E., Wesselink, PR., & van der Sluis, LW.** (2010): "The effect of needle-insertion depth on the irrigant flow in the root canal: evaluation using an unsteady computational fluid dynamics model", *J Endod*, 36(10), pp.1664-1668.
- Brito, PR., Souza, LC., & Machado de Oliveira, JC.** (2009): "Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study", *J Endod*, 35, pp.1422-1427.
- Byström, A., & Sundqvist, G.** (1985): "The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy", *Int Endod J.*, 18(1), pp.35-40.
- Cambuzzi JV, & Marshall FJ.** (1983): "Molar endodontic surgery", *J Can Dent Assoc*, 49(1), pp.61-65.

- Cameron, JA.** (1988): "The effect of ultrasonic endodontics on the temperature of the root canal wall", *J Endod*, 14(11), pp.554–559
- Căpută, PE., Retsas, A., Kuijk, L., Chávez de Paz, LE., & Boutsoukis, C.** (2019): "Ultrasonic Irrigant Activation during Root Canal Treatment: A Systematic Review", *J Endod*, 45, pp.31-44.
- Chan, R., Versiani, MA., Friedman, S., Malkhassian, G., Sousa-Neto, MD., Leoni, GB., Silva-Sousa, YTC., & Basrani, B.** (2019): "Efficacy of 3 Supplementary Irrigation Protocols in the Removal of Hard Tissue Debris from the Mesial Root Canal System of Mandibular Molars", *J Endod*, 45(7), pp.923-929.
- Chávez de Paz, LE.** (2007): "Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities", *J Endod*, 33, pp.652-662.
- Chavez de Paz, LE.** (2009): "Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms", *Appl Environ Microbiol*, 75(6), 1734-1739.
- Cherian, B., Gehlot, PM., & Manjunath, MK.** (2016): "Comparison of the antimicrobial efficacy of octenidine dihydrochloride and chlorhexidine with and without passive ultrasonic irrigation - an in vitro study", *J Clin Diagn Res*, 10(6), ZC71-77.
- Chopra, S., Murray, PE., & Namerow, KN.** (2008): "A scanning electron microscopic evaluation of the effectiveness of the F-file versus ultrasonic activation of a K-file to remove smear layer", *J Endod.*, 34(12), pp.1234–1235
- Chow, TW.** (1983): "Mechanical effectiveness of root canal irrigation", *J Endod*, 9(11), pp.475-479.
- Cloete, TE.** (2003): "Resistance mechanism of bacteria to antimicrobial compounds", *International Biodeterioration Biodegradation*, 5, pp.277-282.
- Cohen, J.** (1988): "Statistical power analysis for the behavioral sciences", Hillside, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.
- Costerton, JW., Stewart, PS., & Greenberg, EP.** (1999): "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections", *Science*, 284(5418), pp.1318-1322.
- Cunningham, WT., Martin, H., & Forrest WR.** (1982): "Evaluation of root canal debridement by the endosonic ultrasonic synergistic system", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 53, pp.401–4
- da Mota, AC., Gonçalves, ML., Bortoletto, C., Olivan, SR., Salgueiro, M., Godoy, C., Altavista, OM., Pinto, MM., Horliana, AC., Motta LJ., & Bussadori, SK.** (2015): "Evaluation of the effectiveness of photodynamic therapy for the endodontic treatment of primary teeth: study protocol for a randomized controlled clinical trial", *Trials*, 16, pp.551.
- Davies, D.** (2003): "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents", *Nat Rev Drug Discov*, 2, pp.114-122.

**Debelian, G., & Trope, M.** (2015): "Cleaning the third dimension", *Endodontic Practice*, 8, pp.22–24

**Decho, A.** (2000): "Microbial biofilms in intertidal systems: an overview", *Continental Shelf Research*, 20, pp.1257-1273.

**De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J Jr, Paciornik S.** (2008): "Longitudinal co-site optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model", *J Endod*, 34(1), pp.71-75.

**de Gregorio, C., Estevez, R., Cisneros, R., Heilborn, C., & Cohenca, N.** (2009): "Effect of EDTA, sonic, and ultrasonic activation on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals: an in vitro study", *J Endod*, 35(6), pp.891-895.

**de Gregorio, C., Estevez, R., Cisneros, R., Paranjpe, A., & Cohenca, N.** (2010): "Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study", *J Endod*, 36, pp.1216-1221.

**De Meyer, S., Meire MA., Coenye, T., & De Moor, RJ.** (2017): "Effect of laser-activated irrigation on biofilms in artificial root canals", *Intl Endod J*, 50, pp.472-479.

**Deleu, E., Meire, MA., & De Moor, RJ.** (2015): "Efficacy of laser-based irrigant activation methods in removing debris from simulated root canal irregularities", *Lasers Med Sci*, 30, pp.831-835.

**de Pablo, OV., Estevez, R., Péix-Sánchez, M., Heilborn, C., & Cohenca, N.** (2010): "Root anatomy and canal configuration of the permanent mandibular first molar: A systematic review", *J Endod*, 36, pp.1919-1931.

**Del Fabbro, M., Samaranayake, LP., Lolato, A., Weinstein, T., & Taschieri, S.** (2014): "Analysis of the secondary endodontic lesions focusing on the extraradicular microorganisms: an overview", *J Investig Clin Dent*, 5, pp.245-254.

**Denotti, G., Piga, R., Montaldo, C., Erriu, M., Pilia, F., & Piras, A.** (2009): "In vitro evaluation of *Enterococcus faecalis* adhesion on various endodontic medicaments", *Open Dent J*, 3, pp.120-124.

**Distel, JW., Hatton, JF., & Gillespie, MJ.** (2002): "Biofilm formation in medicated root canals", *J Endod*, 28(10), pp.689-693.

**Dogan, H., & Qalt, S.** (2001): "Effects of chelating agents and sodium hypochlorite on mineral content of root dentin", *J Endod*, 27(9), pp.578-580.

**Dumitriu, D., & Dobre, T.** (2015): "Effects of Temperature and Hypochlorite Concentration on the Rate of Collagen Dissolution", *J Endod*, 41(6), pp.903-906.

**Duque, JA., Duarte, MA., & Canali, LC.** (2017): "Comparative effectiveness of new mechanical irrigant agitating devices for debris removal from the canal and isthmus of mesial roots of mandibular molars", *J Endod*, 43, pp.326-331.

- Eddy, RS., Joyce, AP., Roberts, S., Buxton, TB., & Liewehr F.** (2005): "An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E. faecalis* in bovine incisors", *J Endod*, 31(9), pp.672-675
- Eick, JD., Wilko, RA., Anderson, CH., & Sorensen, SE.** (1970): "Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe", *J Dent Res*, 49(6), pp.1359-1368
- Endal, U., Shen, Y., Knut, A., Gao, Y., & Haapasalo, M.** (2011): "A high resolution computed tomographic study of changes in root canal isthmus area by instrumentation and root filling", *J Endod*, 37(2), pp.223-227.
- Endo, MS., Ferraz, CCR., Zaia, AA., Almeida, JFA., & Gomes, B.** (2013): "Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: monitoring of the endodontic retreatment", *Eur J Dent*, 7, pp.302–309.
- Engström, B.** (1964): "The significance of enterococci in root canal treatment", *Odontol Revy*, 15, pp.87-106.
- Estrela, C., Rabelo, LE., de Souza, JB., Alencar, AH., Estrela, CR., Sousa Neto, MD., & Pécora JD.** (2015): "Frequency of Root Canal Isthmi in Human Permanent Teeth Determined by Cone-beam Computed Tomography", *J Endod*, 41(9), pp.1535-1539.
- Evans, M., Davies, JK., Sundqvist, G., & Figdor, D.** (2002): "Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide", *Int Endod J*, 35, pp.221-228.
- Ferrari, PHP., Cai, S., & Bombana, AC.** (2005): "Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections", *Int Endod J*, 38(6), pp.372-380.
- Figdor, D., Davies, JK., & Sundqvist, G.** (2003): "Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum", *Oral Microbiol Immunol*, 18(4), pp.234-239.
- Foster, KH., Kulild, JC., & Weller, RN.** (1993): "Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin". *J Endod*, 19(3), pp.136-140.
- Frais, S., Ng, YL., & Gulabivala, K.** (2001): "Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite", *Int Endod J*, 34(3), pp.206-215.
- Franz, CM., Stiles, ME., Schleifer, KH., & Holzapfel, WH.** (2003): "Enterococci in foods—a conundrum for food safety", *Int J Food Microbiol*, 88(2-3), pp.105-122.
- George, S., Kisben, A., & Song, KP.** (2005): "The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*", *J Endod*, 31, pp.867-72.
- Girard, S., Paqué, F., Badertscher, M., Sener, B., & Zehnder, M.** (2005): "Assessment of a gel-type chelating preparation containing 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate", *Int Endod J*, 38(11), pp.810-816.

- Goldman, M., Kronman, JH., Goldman, LB., Clausen, H., & Grady, J.** (1976): "New method of irrigation during endodontic treatment", *J Endod*, 2(9), pp.257-260.
- Gomes, BP., Ferraz, CC., Vianna, ME., Berber, VB., Teixeira, FB., & Souza-Filho, FJ.** (2001): "In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*", *Int Endod J*, 34(6), pp.424-428.
- Gomes, BP., Pinheiro, ET., Gadê-Neto, CR., Sousa, ELR., Ferraz, CCR., Zaia, AA., & Souza-Filho, FJ.** (2004): "Microbiological examination of infected dental root canals", *Oral Microbiol Immunol*, 19(2), pp.71-76.
- Grawehr, M., Sener, B., Waltimo, T., & Zehnder M.** (2003): "Interactions of ethylenediamine tetracetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions", *Int Endod J*, 36(6), pp.411-417.
- Gu, L., Kim, JR., Ling, J., Choi, KK., Pashley, DH., & Tay, FR.** (2009): "Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices", *J Endod*, 35, pp.791-803.
- Guerreiro-Tanomaru, JM., Nascimento, C. A., Faria-Júnior, NB., Graeff, MSZ., Watanabe, E., & Tnetuschilanomaru-Filho, M.** (2014): "Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy", *Int Endod J*, 47(11), pp.1058-1063.
- Gulabivala, K., Ng, YL., Gilbertson, M., & Eames, I.** (2010): "The fluid mechanics of root canal irrigation", *Physiol Meas*, 31(12), pp.49-84.
- Gutarts, R., Nusstein, J., Reader, A., & Beck, M.** (2005): "In vivo Debridement Efficacy of Ultrasonic Irrigation following Hand-rotary Instrumentation in Human Mandibular Molars", *J Endod*, 31(3), pp.166-170.
- Haapasalo, MK., & Orstavik, D.** (1987): "In vitro infection and disinfection of dentinal tubules", *J Dent Res*, 66, pp.1375-1379.
- Haapasalo, HK., Siren, EK., Waltimo, TMT., Orstavik, D., & Haapasalo, MPP.** (2000): "Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study", *Int Endod J*, 33(2), pp.126-131.
- Haapasalo, MK., Udnæs, T., & Endal, U.** (2003): "Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment", *Endod Topics*, 6(1), pp.29-56.
- Hargreaves, KM., & Berman, LH.** (2016): *Cohen. Vías de la pulpa*, Barcelona, Elsevier.
- Harris, SP., Bowles, WR., Fok, A., & McClanahan, SB.** (2013): "An anatomic investigation of the mandibular first molar using micro-computed tomography", *J Endod*, 39, pp.1374-1378.
- Hartmann, MSM., Barletta, FB., Fontanella, VRC., & Vanni, JR.** (2007): "Canal transportation after root canal instrumentation: a comparative study with computed tomography", *J Endod*, 33(8), pp.962-965.
- Hauser, V., Braun, A., & Frentzen, M.** (2007): "Penetration depth of a dye marker into dentine using a novel hydrodynamic system (RinsEndo)", *Int Endod J*, 40(8), pp.644-52.

- Hennequin, M., Pajot, J., & Avignant, D.** (1994): "Effects of different pH values of citric acid solutions on the calcium and phosphorus contents of human root dentin", *J Endod*, 20(11), pp.551-554.
- Hsieh, YD., Gau, CH., Kung, Wu SF., Shen, EC., Hsu, PW., & Fu, E.** (2007); "Dynamic recording of irrigating fluid distribution in root canals using thermal image analysis", *Int Endod J*, 40, pp.11-17.
- Hsu, Y., & Kim, S.** (1997): "The resected root surface. The issue of canal isthmuses", *Dent Clin North Am*, 41(3), pp.529 - 540.
- Huang, CT., Yu, FP., McFeters, GA., & Stewart, PS.** (1995): "Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection", *Appl Environ Microbiol*, 61(6), pp.2252-2256.
- Hubble, TS., Hatton, JF., Nallapareddy, SR., Murray, BE., & Gillespie, MJ.** (2003): "Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin", *Oral Microbiol Immunol*, 18(2), pp.121-126.
- Hülsmann, M., Heckendorff, M., & Lennon, A.** (2003): "Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use", *Int Endod J*, 36(12), pp.810-830.
- James, GA., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, Ed., Secor, P., & Sestrich, J.** (2008): "Biofilms in chronic wounds", *Wound Repair Regen*, 16, pp.37-44
- Jensen, SA., Walker, TL., Hutter, JW., & Nicoll, BK.** (1999): "Comparison of the cleaning efficacy of passive sonic activation and passive ultrasonic activation after hand instrumentation in molar root canals", *J Endod*, 25(11), pp.735–738.
- Jhajharia, K., Parolia, A., Shetty, KV., & Mehta, LK.** (2015): "Biofilm in endodontics: a review", *J Int Soc Prev Community Dent*, 5, pp.1-12
- Jiang, LM., Verhaagen, B., Versluis, M., & van der Sluis, LW.** (2010): "Influence of the oscillation direction of an ultrasonic file on the cleaning efficacy of passive ultrasonic irrigation", *J Endod*, 36, pp.1372-1376.
- Jiménez-Rubio, A., Segura, JJ., Llamas, R., Jiménez-Planas, A., Guerrero, JM., & Calvo, JR.** (1997): "In vitro study of the effect of sodium hypochlorite and glutaraldehyde on substrate adherence capacity of macrophages", *J Endod*, 23(9), pp.562-564.
- Jodaikin, A., & Austin, JC.** (1981): "Smear layer removal with chelating agents after cavity preparation", *J Prosthet Dent*, 46, pp.171–174.
- Johnson, M., Sidow, SJ., Looney, SW., Lindsey, K., Niu, LN., & Tay, FR.** (2012): "Canal and isthmus debridement efficacy using a sonic irrigation technique in a closed-canal system", *J Endod*, 38, pp.1265-1268.

**Joyce, E., Phull, SS., Lorimer, JP., & Mason, TJ.** (2003): "The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species", *Ultrason Sonochem*, 10(6), pp.315-318.

**Kahn, FH., Rosenberg, PA., & Gliksberg, J.** (1995): "An in vitro evaluation of the irrigating characteristics of ultrasonic and subsonic handpieces and irrigating needles and probes", *J Endod.*, 21(5), pp.277-80.

**Kakehashi, S., Stanley, HR., & Fitzgerald, RJ.** (1965): "The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 20, pp.340-349.

**Kaprelyants, AS., & Kell, DB.** (1992): "Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry", *J Appl Bacteriol*, 72(5), pp.410-422.

**Kaprelyants, AS., Gottschal, JC., Kell, DB.** (1993): "Dormancy in non-sporulating bacteria", *FEMS Microbiol Rev*, 10, pp.271-285.

**Karale, R., Thakore, A., & Shetty, V.** (2011): "An evaluation of antibacterial efficacy of 3% sodium hypochlorite, high-frequency alternating current and 2% chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: An in vitro study", *J Conserv Dent*, 14, pp.2

**Karunakaran, JV., PremKumar, MM., Aarthi, G., Jayaprakash, N., & Kumar, SS.** (2019): "Isthmus Incidence in Human Permanent Mandibular First Molars of a South Indian Population: A Cone-Beam Computerized Tomographic Study", *J Pharm Bioallied Sci*, 11, S468-S473.

**Keles, A., Alcin, H., Sousa-Neto, MD., & Versiani, MA.** (2016): "Supplementary steps for removing hard tissue debris from isthmus-containing canal systems", *J Endod*, 42(11), pp.1677-1682.

**Khemaleelakul, S., Baumgartner, JC., & Pruksakom, S.** (2006): "Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections", *J Endod*, 32, pp.312-318.

**Kishen, A.** (2010): "Advanced therapeutic options for endodontic biofilms", *Endod Topics*, 22(1), pp.99-123.

**Koo, H., Xiao, J., Klein, MI., & Jeon, JG.** (2010): "Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms", *J Bacteriol*, 192, pp.3024-3032.

**Kuboniwqa, M., Tribble, GB., Hendrikson, EL., Amano, A., Lamont, RJ., & Hackett, M.** (2012): "Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics", *Expert Rev Proteomics*, 9, pp.311-323.

**Lee, W., Lim, S., Son, HH., & Bae, KS.** (2004): "Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes", *J Endod*, 30(4), pp.209-212.

**Leonardo, MR., Rossi, MA., Silva, LA., Ito, IY., & Bonifácio, KC.** (2002): "Evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth", *J Endod*, 28, pp.815-818.

**Leoni, GB., Versiani, MA., Silva-Sousa, YT., Bruniera, JFB., Pécora, JD., & Sousa-Neto, MD.** (2017): "Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars", *Int Endod J*, 50(4), pp.398-406

**Lester, KS., & Boyde, A.** (1977): "Scanning electron microscopy of instrumented, irrigated and filled root canals", *Br Dent J*, 143, pp.359-367.

**Liébana Ureña, J.** (2002): "Microbiología de los procesos endodónticos", *Microbiología Oral*, Madrid, McGraw-Hill Interamericana, pp.597-605.

**Lima, FJ., Montagner, F., Jacinto, RC., Ambrosano, GM., & Gomes, BP.** (2014): "An in vitro assessment of type, position and incidence of isthmus in human permanent molars", *J Appl Oral Sci*, 22(4), pp.274-281

**Liu, H., & Fang, HH.** (2002): "Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges", *J Biotechnol*, 95(3), pp.249-256.

**Lottanti, S., Gautschi, H., Sener, B., & Zehnder, M.** (2009): "Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer", *Int Endod J*, 42(4), pp.335-343.

**Love, RM.** (1996): "Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury", *Endod Dent Traumatol*, 12(6), pp.289-293.

**Love, RM.** (2001): "*Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure", *Int Endod J*, 34(5), pp.399-405.

**Lumley, P., Walmsley, A., Walton, R., & Rippin, J.** (1993): "Cleaning of oval canals using ultrasonic or sonic instrumentation", *J Endod*, 19(9), pp.453-457.

**Macedo, RG., Wesselink, PR., Zaccheo, F., Fanali, D., & van Der Sluis, LWM.** (2010): "Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH", *Int Endod J*, 43(12), pp.1108-1115.

**Macedo, MG., Verhaagen, B., Fernandez-Rivas, D., Gardeniers, GJE., van der Sluis, LWM., Wesselink, PR., & Versluis, M.** (2014): "Sonochemical and high-speed optical characterization of cavitation generated by an ultrasonically oscillating dental file in root canal models", *Ultrason Sonochem*, 21(1), pp.324-335.

**Mah, TF., & O'Toole, GA.** (2001): "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents", *Trends Microbiol*, 9(1), pp.34-39.

**Markvart, M., Darvann, TA., Larsen, P., Dalstra, M., Kreiborg, S., & Bjørndal, L.** (2012): "Micro-CT analyses of apical enlargement and molar root canal complexity", *Int Endod J*, 45(3), pp.273-281.

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

**McComb, D., & Smith, DC.** (1975): "A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures", *J Endod*, 1, pp.238-242.

**McDonnell, G., & Russell, AD.** (1999): "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance", *Clin Microbiol Rev.*, 12(1), pp.147-179.

**Mohammed, SA., Vianna, ME., Penny, MR., Hilton, ST., Mordan, NJ., Knowles, C.** (2018): "Investigations into in situ *Enterococcus faecalis* biofilm removal by passive and active sodium hypochlorite irrigation delivered into the lateral canal of a simulated root canal model", *Int Endod J*, 51, pp.649-662.

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

**Molecular Probes.** (2004): LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kits. *Product information*, Juli.

**Moorer, WR., & Wesselink, PR.** (1982): "Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite", *Int Endod J*, 15(4), pp.187-196.

**Morago, A., Ruiz-Linares, M., Ferrer-Luque, CM., Baca, P., Rodríguez-Archilla, A., & Arias-Moliz, MT.** (2019): "Dentine tubule disinfection by different irrigation protocols", *Micros Res Tech*, 82, pp.558-563.

**Mounton, C., & Robert, JC.** (1995): "Infecciones endodontales y periapicales", *Bacteriología Bucodental*, Barcelona, Masson, pp. 115-127.

**Munson, MA., Pitt-Ford, T., Chong B., Weightman, A., & Wade WG.** (2002): "Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections", *J Dent Res*, 81(11), pp.761-766.

**Nair, PN., Sjögren, U., Krey, G., Kahnberg, KE., & Sundqvist, G.** (1990): "Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study", *J Endod*, 16(12), pp.580-588.

**Nair, PN., Henry, S., Cano, V., & Vera, J.** (2005): "Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after one-visit endodontic treatment", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 99(2), pp.231-252.

**Nair, PN.** (2006): "On the causes of persistent apical periodontitis: a review", *Int Endod J*, 39, pp.249-281

**Narayanan, LL., & Vaishnavi, C.** (2010): "Endodontic microbiology", *J Conserv Dent*, 13, pp.233–239.

**Neelakantan, P., Varughese, A. A., Sharma, S., Subbarao, CV., Zehnder, M., & De-Deus, G.** (2012): "Continuous chelation irrigation improves the adhesion of epoxy resin-based root canal sealer to root dentine", *Int Endod J*, 45(12), pp.1097-1102.

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

**Neelakantan, P., Devaraj, S., & Jagannathan, N.** (2016): "Histologic assessment debridement of the root canal isthmus of mandibular molars by irrigant activation techniques ex vivo", *J Endod*, 42 (8), pp.1268-1272.

**Netuschil, L., Ausschill, TM., Sculean, A., & Arweiler, NB.** (2014): "Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms-which stain is suitable", *BMC Oral Health*, 14, 2. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-2>

**Nidambur, VB., Poornika, G., Padmaja, AS., Paul, M H Dummer.** (2020): "Evaluation of various irrigation activation systems to eliminate bacteria from the root canal system: A randomized controlled single blinded trial", *J Dent*, 99, 103412.

**Nielsen, BA., & Craig, Baumgartner J.** (2007): "Comparison of the EndoVac system to needle irrigation of root canals", *J Endod.*, 33(5), pp.611-615.

**Noiri, Y., Ehara, A., Kawahara, T., Takemura, N., & Ebisu, S.** (2002): "Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis", *J Endod*, 28(10), pp.679-783.

**Orstavik, D., & Haapasalo, M.** (1990): "Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules", *Endod Dent Traumatol*, 6(4), pp. 142-149.

**Pacheco-Yanes, J., Provenzano, JC., Marceliano-Alves, MF., Gazzaneo, I., Pérez, AR., Gonçalves, LS., & Siqueira, JF Jr.** (2019): "Distribution of sodium hypochlorite throughout the mesial root canal system of mandibular molars after adjunctive irrigant activation procedures: a micro-computed tomographic study", *Clin Oral Investig*, 24(2), pp.907-914.

**Paiva, SS., Siqueira, JF Jr., Rôças, IN., Carmo, FL., Leite, DC., Ferreira, DC., Rachid, CT., & Rosado, AS.** (2013): "Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study", *J Endod*, 39(2), pp.190-194.

**Paqué, F., Musch, U., & Hülsmann, M.** (2005): "Comparison of root canal preparation using RaCe and ProTaper rotary Ni-Ti instruments", *Int Endod J*, 38(1), pp.8-16.

**Paqué, F., Boessler, C., & Zehnder, M.** (2011): "Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps", *Int Endod J*, 44(2), pp.148-153.

**Paqué, F., Zehnder, M., & De-Deus, G.** (2011): "Microtomography-based comparison of reciprocating single-file F2 ProTaper technique versus rotary full sequence", *J Endod*, 37(10), pp.1394–1397.

**Paqué, F., Rechenberg, D. K., & Zehnder, M.** (2012): "Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant", *J Endod*, 38(5), pp.692-695.

**Pashley DH.** (1989): "Dentin: a dynamic substrate. A review", *Scan Microsc*, 3(1), pp.161-176.

**Pereira, RS., Rodrigues, VAA., Furtado, WT., Gueiros, S., Pereira, GS., & Avila-Campos, MJ.** (2017): "Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure", *Anaerobe*, 48, pp.12-18.

**Peters, OA., Schönenberger, K., & Laib, A.** (2001): "Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography", *Int Endod J*, 34(3), pp.221-230.

**Peters, OA., Arias, A., & Paque, F.** (2015): "A micro-computed tomographic assessment of root canal preparation with a novel instrument, TRUShape, in mesial roots of mandibular molars", *J Endod*, 41(9), pp.1545–1550.

**Piard, JC., & Desmazeaud, M.** (1992) : "Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances", *Le Lait*, 72(2), pp.113-142.

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

**Plotino, G., Pameijer, CH., Grande, NM., & Somma, F.** (2007): "Ultrasonics in Endodontics: A Review of the Literature", *J Endod*, 33(2), pp.81–95.

**Raisingani, D., & Meshram, GK.** (2010): "Cleanliness in the Root Canal System: An Scanning Electron Microscopic Evaluation of Manual and Automated Instrumentation using 4% Sodium Hypochlorite and EDTA (Glyde File Prep)—An in vitro Study", *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.*, 3(3), pp.173-182.

**Ram, Z.** (1977): "Effectiveness of root canal irrigation", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 44(2), pp.306-312.

**Ran, SJ., Jiang, W., Zhu, CL., & Liang, JP.** (2015): "Exploration of the mechanisms of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in glucose starvation environments", *Aust Dent J*, 60(2), pp.143-153.

**Ran, SJ., Liu, B., Jiang, W., Sun, Z., & Liang, J.** (2015): "Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress", *Front Microbiol*, 6, pp.795.

- Richards, MJ., Edwards, JR., Culver, DH., & Gaynes, RP.** (2000): "Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States", *Infect Control Hosp Epidemiol*, 21(8), pp.510-515.
- Ricucci, D., Siqueira, JF Jr., Bate, AL., Pitt Ford, TR.** (2009): "Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients", *J Endod*, 35(4), pp.493-502.
- Ricucci, D., & Siqueira, JF Jr.** (2010): "Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings", *J Endod*, 36(8), pp.1277-1288.
- Roberts, AP., & Mullany, P.** (2010): "Oral Biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance", *Expert Rev Anti Infect*, 20, pp.1441-1450.
- Rôças, IN., Siqueira, JF., & Santos, KR.** (2004): "Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases", *J Endod*, 30(5), pp.315-320.
- Rôças, IN., & Siqueira, JF Jr.** (2012): "Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease", *J Clin Microbiol*, 50(5), pp.1721-1724.
- Rôças, IN., Versiani, MA., Sousa-Neto, MD., Provenzano, JC., & Siqueira, JF Jr.** (2016): "Adjunctive steps for disinfection of the mandibular molar root canal system: a correlative bacteriologic, microcomputed tomography, and cryopulverization approach", *J Endod*, 42(11), 1667-1672.
- Roy, RA., Ahmad, M., & Crum, LA.** (1994): "Physical mechanisms governing the hydrodynamic response of an oscillating ultrasonic file", *Int Endod J*, 27, pp.197-207.
- Rotstein, I., Dankner, E., Goldman, A., Heling, I., Stabholz, A., & Zalkind, M.** (1996): "Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching", *J Endod*, 22(1), pp.23-25.
- Russell, RG., & Rogers, MJ.** (1999): "Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. Bone", *Elsevier Science Inc.*, 25(1), pp.97-106.
- Sahar-Helft, S., Sarp, AS., Stabholtz, A., Gutkin, V., Redenski, I., & Steinberg, D.** (2015): "Comparison of positive-pressure, passive ultrasonic, and laser-activated irrigations on smear-layer removal from the root canal surface", *Photomed Laser Surg*, 33(3), pp.129-135.
- Sasanakul, P., Ampornaramveth, RS., Chivatxaranukul, P.** (2019): "Influence of Adjuncts to Irrigation in the Disinfection of Large Root Canals", *J Endod*, 45, pp.332-337.
- Sawilowsky, S.** (2009): "New effects size rules of thumb", *Journal of Modern Applied Statistical Methods*, 8(2), 597-599.
- Schirrmeister, JF., Liebenow, AL., Pelz, K., Wittmer, A., Serr, A., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A.** (2009): "New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions", *J Endod*, 35, pp.169-174.
- Scheie, AA., & Petersen, FC.** (2004): "The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral disease", *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, pp.4-12.

**Schlapp Plavan, G., & Schlapp, G.** (2009). Biofilms de *Proteus Mirabilis* uropatogénico: etapas de formación y papel de flagelos y fimbrias (No. 579.222 SCH).

**Schoeffel, GJ.** (2008): "The EndoVac method of endodontic irrigation, part 2—efficacy", *Dent Today*, 27(1), pp.82, 84, 86, 87.

**Schuster, M., Lostroh, CP., Ogi, T., & Greenberg, EP.** (2003): "Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis", *J Bacteriol*, 185, pp.2066-2079.

**Sedgley, C., Applegate, B., Nagel, A., & Hall, D.** (2004): "Real-time imaging and quantification of bioluminescent bacteria in root canals in vitro", *J Endod*, 30(12), pp.893-898.

**Sedgley, CM., Lennan, SL., & Clewell, DB.** (2004): "Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci", *Oral Microbiol Immunol*, 19(2), pp.95-101.

**Sedgley, CM., Nagel, AC., Hall, D., & Applegate, B.** (2005): "Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro", *Int Endod J*, 38(2), pp.97-104.

**Sedgley, C., Nagel, A., Dahlen, G., Reit, C., & Molander, A.** (2006): "Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals", *J Endod*, 32, pp.173-177.

**Shen, Y., Stojcic, S., & Haapasalo, M.** (2010): "Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture<sup>2</sup>", *J Endod*, 36(11), pp.1820-1823.

**Shi, L., Günther, S., Hübschmann, T., Wick, L. Y., Harms, H., & Müller, S.** (2007): Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry Part A*, 71(8), pp.592-598.

**Silva, EJNL., Rover, G., Belladonna, FG., Herrera, DR., De-Deus, G., & da Silva-Fidalgo, TK.** (2019): "Effectiveness of passive ultrasonic irrigation on periapical healing and root canal disinfection: a systematic review", *Br Dent J*, 227(3), pp.228-234.

**Silva e Souza, PAR., das Dores, RSE., Tartari, T., Pinheiro, TPS., Tuji, FM., & Silva e Souza, MH.** (2014): "Effects of sodium hypochlorite associated with EDTA and etidronate on apical root transportation", *Int Endod J*, 47(1), pp.20-25.

**Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M.** (2002): "Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals", *J Endod*, 28(3), pp.181-4.

**Siqueira, JF., & Jr., Rôças I.N.** (2011): "Optimising Single-visit Disinfection with Supplementary Approaches: A Quest for Predictability", *Aust Endod J*, 37(3), pp.92–98.

**Siqueira Junior, JF.** (2011): "Treatment of endodontic infections. London: Quintessence Publishing", pp. 43-93.

**Siqueira JF Jr, Antunes HS, Rôças IN, Rachid CT, Alves FR.** (2016): "Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis", *Plos One*, 11(9), e0162887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162887>

**Sjögren, ULF., Hägglund, B., Sundqvist, G., & Wing, K.** (1990): "Factors affecting the long-term results of endodontic treatment", *J Endod*, 16(10), pp.498-504.

**Spoorthy, E., Velmurugan, N., Ballal, S., & Nandini, S.** (2013): "Comparison of irrigant penetration up to working length and into simulated lateral canals using various irrigating techniques", *Int Endod J*, 46(9), pp.815-822.

**Stewart, PS., Grab, L., & Diemer, JA.** (1998): "Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system", *J Appl Microbiol*, 85(3), pp.495-500.

**Struzyckal.** (2014): "The Oral Microbiome in Dental Caries", *Polish J Microbiol*, 63, pp.127-135.g

**Stuart, CH., Schwartz, SA., Beeson, TJ., & Owatz, CB.** (2006): "*Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment", *J Endod*, 32(2), pp.93-98.

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

**Tanomaru, FM., Torres, FF., Chavez-Andrade, GM., Miano, LM., & Guerreiro-Tanomaru, JM.** (2016): "Intermittent or continuous ultrasonically activated irrigation: micro-computed tomographic evaluation of root canal system cleaning", *Clin Oral Investig*, 20, pp.1541-1546

**Tartari, T., Guimarães, B. M., Amoras, LS., Duarte, MAH., Silva e Souza, PAR., & Bramante, CM.** (2015): "Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter", *Int Endod J*, 48(4), pp.399-404.

**Tay, FR., Gu, LS., Schoeffel, GJ., Wimmer, C., Susin, L., Zhang, K., Arun, SN., Kim, J., Looney, SW., & Pashley, DH.** (2010): "Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive-pressure irrigant delivery", *J Endod*, 36(4), pp.745-750.

**Teixeira, FB., Sano, CL., Gomes, BP., Zaia, AA., Ferraz, CC., & Souza-Filho, FJ.** (2003): "A preliminary in vitro study of the incidence and position of the root canal isthmus in maxillary and mandibular first molars", *Int Endod J*, 36(4), pp. 376-380.

**Tejada, S., Baca, P., Ferrer-Luque, CM., Ruiz-Linares, M., Valderrama, MJ., Arias-Moliz, MT.** (2019) Influence of dentine debris and organic tissue on the properties of sodium hypochlorite solutions. *Int Endod J*, 52, pp.114-22.

**Tendolkar, PM., Baghdayan, A S., & Shankar, N.** (2003): "Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century", *Cell Mol Life Sci*, 60(12), pp.2622-2636.

**Thomas, AR., Velmurugan, N., Smita, S., & Jothilatha, S.** (2014): "Comparative evaluation of canal isthmus debridement efficacy of modified EndoVac technique with different irrigation systems", *J Endod*, 40(10), pp.1676-1680.

**Tinelli, ME.** (2011): "Variantes étnicas de la topografía de los conductos radiculares", *Electronic Journal of Endodontics Rosario*, 2, pp.553-557.

**Tolentino, ES., Amoroso-Silva, PA., & Alcalde, MP.** (2018): "Accuracy of High-resolution Small-volume Cone-beam Computed Tomography in Detecting Complex Anatomy of the Apical Isthmi: Ex Vivo Analysis", *J Endod*, 44(12), pp.1862-1866.

**Tolentino, ES., Amoroso-Silva, PA., Alcalde, MP, Honório, HM., Iwaki, LCV., Rubira-Bullen, IRF., & Húngaro-Duarte, MA.** (2020): "Limitation of diagnostic value of cone-beam CT in detecting apical root isthmuses", *J Appl Oral Sci*, 28, e20190168.

**Torabinejad, M., Cho, Y., Ali Klademi, A., Bakland, LK., & Shabahang, S.** (2003): "The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer" *J Endod*, 21(3), pp.179-190.

**van der Sluis, LW., Gambarini, G., Wu, MK., & Wesselink, PR.** (2006): "The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation", *Int Endod J.*, 39(6), pp.472-476.

**van der Sluis, LW., Versluis, M., Wu, MK., & Wesselink, PR.** (2007): "Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature", *Int Endod J*, 40(6), pp.415-26.

**van der Sluis, LW., Wu, MK., & Wesselink, P.** (2009): "Comparison of 2 flushing methods used during passive ultrasonic irrigation of the root canal", *Quintessence Int*, 40, pp. 875-879

**van der Sluis, LW., Vogels, MP., Verhaagen, B., Macedo, R., & Wesselink, PR.** (2010): "Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant", *J Endod*, 36(4), pp.737-740.

**Vera, J., Siqueira Jr, JF., Ricucci, D., Loghin, S., Fernández, N., Flores, B., & Cruz, AG.** (2012): "One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study", *J Endod*, 38(8), pp.1040-1052.

**Versiani, MA., De-Deus, G., Vera, J., Souza, E., Steier, L., Pécora, JD., & Sousa-Neto.** (2015): "3D mapping of the irrigated areas of the root canal space using micro-computed tomography", *Clin Oral Investig*, 19(4), pp.859-866.

**Vertucci, FJ.** (2005): "Root canal morphology and its relationship to endodontic procedures", *Endod Topics*, 10, pp.3-29

**Virdee, SS., Seymour, DW., Farnell, D., Bhamra, G., & Bhakta, S.** (2018): "Efficacy of irrigant activation techniques in removing intracanal smear layer and debris from mature permanent teeth: a systematic review and meta-analysis", *Int Endod J*, 51(6), pp.605-621.

**Wade, WG.** (2013): "The oral microbiome in health and disease", *Pharmacol Res*, 69, pp.137-143.

**Walmsley, AD.** (1987): "Ultrasound and root canal treatment: the need for scientific evaluation", *Int Endod J*, 20, pp.105-111.

- Waltimo, TM., Sen, BH., Meurman, JH., Ørstavik, D., & Haapasalo, MP.** (2003): "Yeasts in apical periodontitis", *Crit Rev Oral Biol Med*, 14(2), pp.128-137
- Wang, Z., Shen, Y., & Haapasalo, M.** (2013): "Effect of Smear Layer against Disinfection Protocols on *Enterococcus faecalis*-infected Dentin", *J Endod*, 39(11), pp.1395-1400.
- Weller, RN., Brady, JM., & Bernier, WE.** (1980): "Efficacy of ultrasonic cleaning", *J Endod*, 6(9), pp.740-743.
- Weller, RN., Niemczyk, SP., & Kim S.** (1995): "Incidence and position of the canal isthmus. Part 1. Mesiobuccal root of the maxillary first molar", *J Endod*, 21(7), pp.380-383
- White, RR., Goldman, M., & Lin PS.** (1984): "The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials", *J Endod*, 10, pp.558-562.
- Woodmansey, KF.** (2005): "Intracanal heating of sodium hypochlorite solution: an improved endodontic irrigant technique", *Dent Today*, 24(10), pp.114-116.
- Wu, MK., & Wesselink, PR.** (2001): "A primary observation on the preparation and obturation of oval canals", *Int Endod J*, 34(2), pp.137-141.
- Wu, MK., Dummer, PM., & Wesselink, PR.** (2006): "Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection", *Int Endod J*, 39(5), pp.343-356.
- Yamada, RS., Armas, A., Goldman, M., & Lin, PS.** (1983): "A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3", *J Endod*, 9, pp.137-142.
- Yasui, K.** (2018): "*Acoustic cavitation and bubble dynamics*", New York, NY: Springer, 37-97.
- Zandi, H., Kristoffersen, AK., Ørstavik, D., Rôça,s IN., Siqueira, JF Jr., & Enersen, M.** (2018): "Microbial Analysis of Endodontic Infections in Root-filled Teeth with Apical Periodontitis before and after Irrigation Using Pyrosequencing", *J Endod*, 44(3), pp.372-378
- Zehnder, M., Schmidlin, P., Sener, B., & Waltimo, T.** (2005): "Chelation in root canal therapy reconsidered", *J Endod*, 31(11), pp.817-820.
- Zehnder, M.** (2006): "Root canal irrigants", *J Endod*, 32(5), pp.389-398.



## **ANEXOS**

---



## 1. PUBLICACIONES

El resultado del trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido publicado en la siguiente revista científica:

*International Endodontic Journal*

Villalta-Briones N, Baca P, Bravo M, Solana C, Aguado-Pérez B, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT. A laboratory study of root canal and isthmus disinfection in extracted teeth using various activation methods with a mixture of sodium hypochlorite and etidronic acid. *International Endodontic Journal*, 54, 268-278, 2021.



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

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

**Villalta-Briones N**, Baca P, Bravo M, Solana C, Aguado-Pérez B, Ruiz-Linares M, Arias-Moliz MT. A laboratory study of root canal and isthmus disinfection in extracted teeth using various activation methods with a mixture of sodium hypochlorite and etidronic acid. *International Endodontic Journal*, 54, 268-278, 2021.

- ISSN: 0143-2885
- ISO: Int. Endod. J.
- Abreviación JCR / JCR Abbrev: INT ENDOD J
- Categorías / Categories: Dentistry, Oral surgery & Medicine
- Índice de impacto / Journal impact factor: 5.264
- Índice de impacto de 5 años / 5 years impact factor: 4,826
- Orden / Rank: 10/91
- Cuartil / Quartile: Q1
- Citas recibidas / Citations: 1 (a 23 de septiembre de 2021)



