

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL NaOCI Y EL CatDex EN UNA MEZCLA
BACTERIANA: *Enterococcus faecalis* y *Porphyromonas endodontalis***

POR

MARÍA FERNANDA MAYELA CARRILLO SOSA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN
EN ENDODONCIA**

DICIEMBRE, 2015

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL NaOCl Y EL CatDex EN UNA MEZCLA BACTERIANA: *Enterococcus faecalis* y *Porphyromonas endodontalis*

Comité de Tesis

C.D., E.E.M.C. Idalia Rodríguez Delgado PhD
Directora de Tesis

C.D. , M.C. Jorge Jaime Flores Treviño
Coodirector de Tesis

ASESORES

C.D.,M.C. Myriam de la Garza Ramos PhD
Asesor Microbiológico

PhD. Erandi Escamilla García
Asesor Metodológico

MSP. Gustavo Israel Martínez González
Asesor Estadístico

**EFEECTO ANTIMICROBIANO DEL NaOCl Y EL CatDex EN
UNA MEZCLA BACTERIANA: *Enterococcus faecalis* y
*Porphyromonas endodontalis***

**C.D., M.C. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
COORDINADOR DEL POSGRADO DE ENDODONCIA**

**C.D., M.E.O. SERGIO EDUARDO NAKAGOSHI CEPEDA PhD
SUBDIRETOR DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE
ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO
LEÓN**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL NaOCI Y EL CatDex EN UNA
MEZCLA BACTERIANA: *Enterococcus faecalis* y *Porphyromonas
endodontalis***

APROBACIÓN DE LA TESIS

LOS MIEMBROS DEL JURADO ACEPTAMOS LA INVESTIGACIÓN Y
APROBAMOS EL DOCUMENTO QUE AVALA LA MISMA; COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA.

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE

C.D., E.E.M.C. Idalia Rodríguez Delgado PhD

**SECRETARIO
DR.**

**VOCAL
DR.**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme cumplir una meta tan importante en mi vida. Por guíarme y acompañarme durante esta etapa llenándome de sabiduría y perseverancia.

A mi papá, que desde el cielo se que me cuida e ilumina, y a quien debo el amor por esta profesión. A mi mamá, por su incondicional amor y apoyo, siempre motivándome a ser mejor. A José, mi gran amor, por creer en mi en todo momento y ser mi motor para seguir adelante.

A mi Directora de Tesis, la Dra. Idalia Rodríguez Delgado, que gracias a sus sabios consejos y constante atención se logró la culminación de este trabajo de manera satisfactoria. Al Dr. Jorge Jaime Flores Treviño, por ser un excelente coordinador, guía y ejemplo a seguir.

A las Dras. Myriam de la Garza y Erandi Escamilla por compartir sus conocimientos conmigo, por guíarme y orientarme durante la realización de este trabajo, que sin su dedicación y esfuerzo esto no hubiera sido posible.

A la bioquímica Vilma Suárez, Dra. Elizabeth Madla, Dra. Mayra Martínez, Dr. Eloy Cárdenas, por sus valiosos consejos y contribuciones.

El resultado de esta investigación es la suma del esfuerzo de cada una de las personas mencionadas para con quienes estaré siempre agradecida.

DEDICATORIA

Este trabajo, como cada logro en mi vida, se lo dedico a mis padres. Por que gracias a su amor, educación, esfuerzo y ejemplo he logrado cumplir exitosamente cada meta que me he propuesto. Gracias por caminar cada día a mi lado, por hacer tuyas mis alegrías, mis preocupaciones y mis triunfos. Gracias por ser la mayor bendición en mi vida.

ÍNDICE

Página

Resumen.....	8
Introducción.....	10
Antecedentes.....	13
Marco de Referencia.....	33
Materiales y Métodos.....	37
Resultados.....	43
Análisis Estadístico.....	57
Discusión.....	60
Conclusiones.....	64
Recomendaciones.....	65
Referencias Bibliográficas.....	66

Nombre: María Fernanda Mayela Carrillo Sosa

Fecha de Graduación: Julio de 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Odontología

Maestría en Ciencias Odontológicas con Orientación en Endodoncia

Páginas: 73

Título del Estudio: Efecto Antimicrobiano del NaOCl y CatDex en una mezcla bacteriana: *Enterococcus faecalis* y *Porphyromonas endodontalis*

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Idealmente, el tratamiento endodóntico debería esterilizar el conducto radicular, es decir, eliminar todos los microorganismos vivos presentes en el sistema de conductos. Sin embargo, debido a la compleja anatomía radicular es utópico en la mayoría de los casos. Por lo que una meta alcanzable es reducir la población bacteriana a los niveles más bajos posibles. La irrigación, de la mano de la instrumentación, juega el rol más importante para lograr dicho objetivo. El NaOCl se considera la solución irrigadora más utilizada en la práctica actual, por su efectividad para eliminar tejido vital y no vital, además de poseer un amplio espectro antibacteriano. Sin embargo, su principal desventaja es su alta toxicidad. El CatDex es una sustancia innovadora que promete igualar el efecto antimicrobiano del NaOCl sin ser tóxica. Si se logra encontrar un irrigante con el mismo efecto que el NaOCl sin que cause reacciones adversas en los pacientes; éste tendrá una mejor aplicación clínica y revolucionará la terapia endodotal.

En el presente trabajo, se indentificó la eficacia antimicrobiana del CatDex en dosis que varían desde el 0.05% al 1% (0.05mM-1mM) y del NaOCl a 1.25, 2.5 y 5% como control positivo, sobre *Enterococcus faecalis* y *Porphyromonas endodontalis*, así como sobre la mezcla de ambas bacterias por medio de una prueba de sensibilidad (método de Kirby Bauer) y una segunda para identificar la dosis mínima necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano, mediante la prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés). *E. faecalis* no mostró sensibilidad al CatDex mientras que *P. endodontalis* sí a concentraciones mayores de 0.12% obteniendo una mayor sensibilidad a 0.12% con un halo de inhibición 9.5 mm. La mezcla bacteriana fue mas sensible al 1% con 8 mm. Ambas bacterias mostraron sensibilidad al NaOCl en las tres concentraciones, con una mayor eficacia al 5.25% obteniendo 9 mm y 9.5 mm de halo para *P. endodontalis* y *E. faecalis* respectivamente. Y la mezcla bacteriana en todas las concentraciones con 8 mm de diámetro formado.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) encontrada para ambas bacterias fue de 0.15% de CatDex para *P. endodontalis*, y 1% para *E. faecalis* y la mezcla, con una reducción de células bacterianas del 55%, 91% y 91% respectivamente. En el caso del control positivo (NaOCl), la inhibición bacteriana se presentó en todas las dosis, obteniendo una mayor inhibición con 5%, y una reducción de células viables fue del 97% en los tres casos. En conclusión, el CatDex, tiene mejor efecto inhibitorio sobre la bacteria *E. faecalis* y para el caso de *P. endodontalis* se requeriría evaluar su efecto a dosis mas elevadas, por encima del 1%, así como realizar estudios paralelos a las

mismas dosis con células de tejido para evaluar también la toxicidad de la molécula, a fin de prever daños adversos en los pacientes.

C.D.E.E.M.C. Idalia Rodríguez Delgado PhD
Directora de Tesis

C.D.M.S. Jorge Jaime Flores Treviño
Co-director de Tesis

INTRODUCCIÓN

El objetivo del tratamiento de conductos es lograr la remoción de restos vitales y necróticos de tejidos pulpares, microorganismos y toxinas microbianas del sistema de conductos radiculares.

Debido a la complejidad de la anatomía radicular esto sólo puede lograrse mediante el uso de una combinación de técnicas asépticas químico-mecánicas, soluciones de irrigación y medicación intraconducto.

El éxito de la terapia endodntal radíca en gran medida en la eliminación de la contaminación bacteriana y sus productos en el interior de los conductos radiculares, los cuales son considerados agentes etiológicos principales de los estados de necrosis pulpar y de las lesiones periapicales. Si bien la instrumentación mecánica puede reducir la población bacteriana, la eliminación efectiva de las bacterias no se puede lograr sin el uso de antimicrobianos de irrigación y la medicación.

Existen zonas como los istmos que incluso después de la instrumentación albergan restos de tejido, microbios y productos derivados que pueden obstaculizar la adaptación del material de obturación y el resultado en la inflamacion persistente perirradicular.

Aúnado a la instrumentación, la irrigación es esencial en el proceso de limpieza y conformación del sistema de conductos radiculares antes de proceder con la obturación tridimensional de los mismos. Ésta se lleva a cabo mediante el empleo de agentes químicos capaces de disolver la materia orgánica y actuar sobre la flora microbiana presente.

Por lo tanto, la irrigación es una parte esencial en el debridamiento del conducto radicular permitiendo una mayor limpieza de lo que podría lograrse mediante la instrumentación.

La solución irrigadora tiene como objetivo primordial facilitar la preparación biomecánica de conductos radiculares.

La evidencia científica indica que los microorganismos son los principales agentes causales del fracaso endodóntico, caracterizado por la persistencia o la aparición de una lesión perirradicular inflamatoria posterior al tratamiento.

Estudios indican que las infecciones endodónticas son de origen polimicrobiano y mixto, de tal manera que incluyen anaerobios estrictos, anaerobios facultativos y microaerófilos. Las diversas especies bacterianas que han sido aisladas de conductos radiculares infectados son; estreptococos, fusobacterium, prevotella y porphyromonas.

Diferentes técnicas de cultivo microbiológico han revelado que el *Enterococcus faecalis* es la especie que con mayor frecuencia se encuentra en infecciones persistentes y secundarias asociadas con el fracaso del tratamiento endodóntico.

El CatDex, es una molécula con potencia antitumoral probada en distintas líneas celulares. Por un lado, hay similitudes en la proliferación, el crecimiento y el desarrollo de las células tumorales y las bacterias, así como una característica entre ambas que es la condición electrostática de la célula en su relación pared-membrana. Por otro lado, estudios recientes muestran la actividad antimicrobiana sobre microorganismos patógenos orales de tipo cariogénico (*Streptococcus mutans*) y de enfermedad periodontal (*Porphyromonas gingivalis*).

Por esto, es relevante comparar soluciones irrigantes como lo son el Hipoclorito de Sodio y el CatDex para identificar su eficacia antimicrobiana y contrastar los resultados.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto antimicrobiano del CatDex con NaOCl en una mezcla bacteriana de *Enterococcus faecalis* y *Porphyromonas endodontalis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar la fase logarítmica de crecimiento de *E. faecalis* y *P. endodontalis* mediante la cinética de crecimiento de cada bacteria.
- 2.- Estudiar el efecto antimicrobiano del CatDex sobre *E. faecalis* y *P. endodontalis* utilizando la técnica de sensibilidad en disco (método Kirby-Bauer).
- 3.- Determinar la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento de *E. faecalis* y *P. endodontalis*, por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI)
- 3.- Determinar el efecto antimicrobiano del CatDex y la CMI en la mezcla bacteriana respectivamente y contrastar los resultados con los del NaOCl.

Dentro de la **HIPÓTESIS** se planteó que; el CatDex tiene igual o mayor efecto antimicrobiano que el NaOCl.

ANTECEDENTES

TERAPIA ENDODÓNTICA

La Asociación Americana de Endodoncia en 2012, define “endodoncia” como la rama de la odontología que se encarga de la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental y los tejidos perirradiculares.

El objetivo primordial del tratamiento endodóntico es eliminar microorganismos presentes en el sistema de conductos, remover tejido pulpar desintegrado que pueda servir como sustrato para el crecimiento microbiano, y rellenar el espacio creado para evitar la recolonización bacteriana. Así como prevenir la periodontitis apical o fomentar su solución. (Ricucci et al., 2009).

La colonización bacteriana del complejo dentino pulpar y del sistema de conductos ha sido implicada como el factor etiológico primario en la enfermedad pulpar y periapical. La eliminación de dichas infecciones ha sido el principal objetivo del tratamiento de conductos por más de un siglo. (Sundqvist et al., 1998).

A pesar de que las técnicas y materiales utilizadas han cambiado y probablemente mejorado, los índices de éxito del tratamiento no han tenido una mejoría significativa. La preparación mecánica y la irrigación reducen la carga bacteriana en distintos grados, pero no logran tener cultivos negativos universalmente. Incluso las técnicas contemporáneas parecen ser incapaces de eliminar las bacterias por completo. Las partes más accesibles del sistema de conductos aparentan ser las mejores debridadas y fomenta la resolución periapical, no obstante existe la presencia del biopelícula residual en las áreas más inaccesibles. (Bryce et al., 2009).

Goldberg et al., 1977, definieron que la terapia endodóntica involucra una serie de procedimientos que comienzan con el adecuado conocimiento de la biología pulpar y periapical; y finaliza con la evaluación subsecuente del tratamiento realizado.

El tratamiento endodóntico de piezas dentales con pulpitis irreversible es esencialmente un tratamiento profiláctico, ya que la pulpa radicular vital usualmente se encuentra libre de infección. Este tratamiento se debe de enfocar en la asepsis, es decir, la prevención de que la infección entre a un medio estéril, como es la porción apical del conducto radicular. (Jenkins et al.,2001).

Por otro lado, en casos de pulpas necróticas infectadas o en conductos asociados a periodontitis apical, se ha establecido una infección intraradicular y como consecuencia el procedimiento endodóntico se debe de enfocar no sólo en la prevención de la entrada de nuevos microorganismos, sino en la eliminación de los que ya se localizan ahí. El éxito del tratamiento endodóntico va a depender de la efectividad del clínico para lograr estos objetivos. (Siqueira and Rocas, 2008).

Debido a la compleja anatomía de los sistemas de conductos radiculares, con sus múltiples ramificaciones. La antisepsis en dientes necróticos o dientes con tratamientos endodónticos fallidos es más desafiante, técnica y microbiológicamente. (Zehnder, 2006).

No queda duda hoy en día, que los microorganismos remanentes en el conducto radicular después del tratamiento o los que re-colonizan el conducto ya obturado, son la principal causa del fracaso endodontal. Por lo que el objetivo principal del tratamiento debe de ser optimizar la desinfección del conducto y prevenir la re-infección. (Sjorgen et al., 1997)

El objetivo microbiológico del tratamiento de piezas con periodontitis apical es reducir los niveles microbianos a niveles compatibles con los tejidos periradiculares, sanando y previniendo la recolonización microbiana del conducto tratado. Esto se puede lograr mediante medidas antimicrobianas que involucren procedimientos químicos mecánicos y medicación intraconducto. (Vera et al., 2012).

Idealmente, el tratamiento endodóntico debe de esterilizar el conducto radicular, es decir eliminar todos los microorganismos vivos presentes en el sistema de

conductos. Sin embargo, debido a la compleja anatomía radicular es utópico en la mayoría de los casos, por lo que una meta alcanzable es reducir la población bacteriana a un nivel menor que el necesario para causar una patología. (Siqueira and Rocas, 2008).

Estudios han revelado que el resultado del tratamiento es influenciado significativamente por la presencia de bacterias en los conductos, en el momento de la obturación. (Siren et al., 1997).

Un resultado favorable del tratamiento endodóntico se define como la reducción de una lesión radiográfica y la ausencia de signos clínicos, después de un periodo mínimo de observación por 1 año. (Zehnder, 2006)

PERIODONTITIS APICAL

La periodontitis apical esencialmente, es una enfermedad inflamatoria de etiología microbiana primordialmente causada por la infección del sistema de conductos. Es multifactorial y requiere una interacción de miembros seleccionados y microbiota endodental mixta. (Cohen and Hargreaves, 2011).

La principal causa de periodontitis apical post-tratamiento se atribuye a la constante presencia de bacterias en el conducto. La existencia de otras especies bacterianas en tejidos perirradiculares y su posible causa en la persistencia de la periodontitis apical, es un tema que sigue en debate.

Los resultados de cultivos, investigaciones, técnicas moleculares y microscópicas han reforzado la presencia de bacterias fuera del ápice de dientes con periodontitis apical. (Ricucci et al., 2009).

Estudios revelan que la composición de la microbiota endodóntica difiere entre individuos. Lo que indica que la periodontitis apical tiene una etiología heterogénea, donde múltiples bacterias juegan un rol en la causa de la enfermedad.

Independientemente de la ruta de acceso bacteriano al sistema de conductos, la necrosis del tejido pulpar es un pre-requisito para el establecimiento de infecciones primarias endodontales. (Cohen and Hargreaves, 2011).

Como la incidencia de infección post-tratamiento es significativamente más alta en casos que presentaron periodontitis apical preoperatoria, es válido inferir que las infecciones persistentes en vez de las secundarias, son la principal causa del fracaso del tratamiento. (Marquis et al., 2006).

La persistencia de periodontitis apical después del tratamiento va a depender más del número de especies que queden en el conducto que de un tipo de bacteria en específico. (Siqueira and Roca, 2008).

MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD ENDODÓNTICA

El estudio clásico publicado en 1965 por Kakehashi et al., se demostró que las bacterias son la causa de la enfermedad pulpar y perirradicular.

La evidencia científica indica que las infecciones endodónticas son de origen polimicrobiano y mixto, de tal manera que incluyen anaerobios estrictos, anaerobios facultativos o microaerofílicos.

El fundamento de las infecciones endodónticas sugiere que el agente patógeno más peligroso no es una especie individual, sino una entidad polimicrobiana que sufre cambios fisiológicos y genéticos influenciados por los cambios que ocurren en el medio que es el conducto radicular. (Chávez, 2007).

Las especies bacterianas que en la actualidad contribuyen a la patología pulpar y periapical son variadas, incluyendo sobre todo los siguientes microorganismos: *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella intermedia*, *Lactobacillus*, *Campylobacter*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga ochracea*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella bucae*, *Prevotella oralis*, *Prevotella denticola*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacter agglomerans*. (Odell et al., 1999).

Sundqvist and Figdor en 1997, sugieren que la definición propia para los patógenos endodónticos debe de incluir cada microorganismo capaz de inducir destrucción de tejidos en la periodontitis apical.

Enterococcus faecalis es un microorganismo que posee cierta resistencia al tratamiento endodóntico, es un coco-positivo anaerobio facultativo. Esto puede explicarse por su capacidad para resistir períodos prolongados de limitación de nutrientes, lo que le permite persistir como un agente patógeno en el conducto radicular. (Grundling et al., 2011)

Según la literatura *P. endodontalis*, está más asociado con tratamientos de conductos que tienen infecciones endodónticas primarias, aunque se observa que coloniza en conductos con ambos tipos de infecciones. (Hong et al., 2015)

En sinergia con otras bacterias, contribuye a abscesos o fístulas de origen endodóntico siendo de los taxones más prevalentes (51%) y a menudo concomitantes. (Qi et al., 2015)

Partiendo de la realidad de que todos los microorganismos orales son capaces de formar biofilm y que dichas comunidades existen en los conductos radiculares, es factible aplicar el concepto al tratamiento clínico. Las investigaciones no deberán ser dirigidas a organismos específicos individuales, sino a los grupos de organismos bien adaptados con mayor resistencia a la variedad de agentes antimicrobianos (Chávez, 2007).

CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Por medio de la cinética de crecimiento se puede estudiar e identificar distintos parámetros correspondientes al comportamiento microbiano que se encuentra adaptándose, duplicándose y desarrollándose en un medio de cultivo específico bajo condiciones de crecimiento óptimas. Es preciso señalar que cada etapa difiere de un microorganismo a otro. A continuación se presentan las fases o etapas que conforman la cinética de crecimiento:

1. Fase logarítmica: El microorganismo se adapta a las condiciones ambientales y comienza a poner en marcha su mecánica metabólica para poder crecer. La duración de esta fase es variable.
2. Fase exponencial: Los microorganismos se encuentran adaptados a las condiciones de cultivo (temperatura, pH, nutrientes, presencia o ausencia de oxígeno, etc.), son capaces de duplicarse y se encuentran metabólicamente activos. Por ende, existe un aumento en la cantidad de biomasa y tamaño celular. Existen células maduras y en reproducción constante.
3. Fase estacionaria: No hay aumento neto de microorganismos, lo que no significa que no se dividan algunos, si no que la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros. Permanece una fase constante.
4. Fase de declinación: Inicia la reducción del número de células por una falta de nutrientes en el medio de cultivo.
5. Fase de muerte: Aquí el número de microorganismos vivos disminuye de forma exponencial que depende de diferentes factores (falta de nutrientes, pH del medio distinto al inicial, metabolitos producidos que pueden resultar tóxicos para las células...)

PREPARACIÓN QUÍMICO MECÁNICA

Uno de los objetivos en la preparación de los conductos radiculares es el desbridamiento. Éste, por lo regular incluye dos procedimientos: la limpieza mecánica a través de la instrumentación y el uso de soluciones irrigantes. La irrigación es complementaria a la instrumentación y ambas necesitan una de la otra para cumplir de manera adecuada su función.

Otros autores, refieren que uno de los principales objetivos del tratamiento de endodoncia es la remoción del tejido desbridado del sistema de conductos radiculares antes de su sellado definitivo; esto se logra por medio de la combinación de la preparación biomecánica y la irrigación (Chow et al.,1983).

Los procedimientos principales del tratamiento endodóntico involucrados con el control de infecciones están representados por la preparación químico-mecánica y la medicación intraconducto.

La preparación químico mecánica es de suma importancia para la desinfección del conducto porque los instrumentos e irrigantes actúan primordialmente en el conducto principal, el cual es el más voluminoso y alberga a la mayor cantidad de bacterias (Siqueira and Rocas, 2008)

El propósito principal de la instrumentación es el desbridamiento mecánico de sistema de conductos radiculares y la creación de un espacio para que actúen las sustancias antimicrobianas. Un conducto bien conformado y libre de bacterias va a facilitar la obturación y la prevención de una re-colonización (Schilder, 1974).

La preparación mecánica es el principal método para reducir la población bacteriana de los conductos. Pero por lo regular, deja una capa de materiales orgánicos e inorgánicos conocido como "smear layer". Esa capa actúa como una barrera física que reduce la permeabilidad de la dentina y retrasa el acceso de los medicamentos a los túbulos dentinarios infectados. Además, las bacterias que quedan en los túbulos están sepultadas tras esta capa. En estos casos las

soluciones antimicrobianas utilizadas deben primero penetrar o remover la smear layer para atacar a las bacterias que se encuentran en la dentina. (Wang et al., 2013)

IRRIGACIÓN

La Asociación Americana de Endodoncia define la irrigación como el lavado mediante una corriente de fluido.

También se ha definido como la introducción de una o más soluciones en la cámara pulpar y en los conductos radiculares y su posterior aspiración; además, es un complemento fundamental de la instrumentación, por lo tanto, debe emplearse antes, durante y después de la misma. (Basrani and Cañete, 1988).

Se ha considerado que la limpieza profunda de la porción apical del sistema de conductos quizás sea el procedimiento más difícil de la terapia endodóntica. (Baker et al., 1975).

Históricamente, se han sugerido muchos compuestos en soluciones acuosas como irrigantes, incluyendo sustancias inertes como el cloruro de sodio (salino) o sustancias altamente tóxicas y alergénicas como el formaldehído (Harrison, 1984).

Es evidente que un irrigante de conductos radiculares debe de:

- a) Tener amplio espectro antimicrobiano y elevada eficacia contra microorganismos aerobios y facultativos organizados en biofilm.
- b) Disolver restos de tejido pulpar necrótico.
- c) Inactivar endotoxinas
- d) Prevenir la formación del smear layer durante la instrumentación o tener la capacidad de disolverlo una vez formado.

A medida en que los irrigantes entren en contacto con tejidos vitales, deben de ser:

- e) No tóxicos
- f) No causticos a tejidos periodontales
- g) Poco potencial de causar reacciones anafilácticas. (Zehnder, 2006)

Es importante mencionar, que algunas de las paredes del conducto principal,

permanecen sin tocar después de la instrumentación. A pesar de que el tejido pulpar es solo una fuente de nutrientes temporal, puede mantener vivas a las bacterias en lo que otra fuente de sustento se establece mediante filtración apical o coronal (Siqueira and Rocas, 2008)

Objetivos de la irrigación del sistema de conductos: (Weine, 1976)

1. Arrastre, retirando los restos de dentina para evitar el taponamiento del conducto radicular.
2. Disolución de agentes orgánicos e inorgánicos del conducto radicular, incluyendo la capa de desecho que se produce en la superficie de la dentina por la acción de los instrumentos, y que se compacta al interior de los túbulos dentinarios.
3. Acción antiséptica o desinfectante.
4. Lubricante, sirviendo como medio de humectación para la instrumentación del conducto radicular.
5. Acción blanqueante, debido a la presencia de oxígeno.

Propiedades de la solución irrigante:

El irrigante ideal según Walton y Torabinejad en 1997:

- a. Ser bactericida o bacteriostático, debe actuar contra hongos y esporas.
- b. Baja toxicidad, no debe ser agresivo para los tejidos perirradiculares.
- c. Solvente de tejidos o residuos orgánicos e inorgánicos.
- d. Baja tensión superficial.
- e. Eliminar la capa de desecho dentinario.
- f. Lubricante
- g. Otros factores: aplicación simple, tiempo de vida adecuado, fácil almacenaje, costo moderado, acción rápida y sostenida.

El clínico debe considerar la biocompatibilidad de la solución irrigadora, el método de transporte dentro del sistema de conductos y el método de instrumentación utilizado en la preparación de los mismos. (Brown et al., 1995)

HIPOCLORITO DE SODIO (NaOCl)

Se considera la solución irrigadora más utilizada en la práctica actual, por ser la que más se acerca a las condiciones ideales por su efectividad para eliminar tejido vital y no vital y además de poseer un amplio efecto antibacteriano, matando rápidamente bacterias, esporas, hongos y virus (incluyendo el HIV, rotavirus, HSV-1 y el virus de la hepatitis A y B). (Siqueira et al., 2000).

Dakin estableció que se utilizara hipoclorito del sodio al 0.5% para tratar heridas abiertas. Se dedujo que en el sistema de conductos radiculares, se debían utilizar concentraciones más altas para que fueran más eficientes. (Grossman, 1943)

El efecto antibacteriano y de disolución de tejidos del hipoclorito de sodio es en función a su concentración y toxicidad. (Zehnder, 2006)

Las concentraciones clínicas varían entre el 0.5% al 6%, la dilución del NaOCl disminuye significativamente la propiedad antibacteriana, de disolución del tejido y de desbridamiento del conducto, al igual que disminuye su toxicidad. (Yesilsoy et al., 1995)

Al parecer la mayoría de los clínicos Americanos utilizan el NaOCl a su máxima concentración: 5.25%, como la venden en la forma de blanqueador para el hogar. Sin embargo se han reportado casos de irritaciones muy severas (Hülsmann, 2000).

La solución al 5.25% disminuye significativamente el módulo elástico y fuerza flexural de la dentina, en comparación con el suero fisiológico, mientras que la solución al 0.5% no lo hace (Sim et al., 2001).

Una alternativa que pretende mejorar la efectividad del NaOCl en los conductos radiculares es incrementar la temperatura del NaOCl a bajas concentraciones. Esto mejora la capacidad de disolución inmediata del tejido. Además remueve debris orgánico de la dentina de manera más eficaz (Kamburis, 2003).

La activación ultrasónica del NaOCl también ha sido recomendada, ya que ésta acelera las reacciones químicas logrando una acción superior de limpieza (Zehnder, 2006)

VENTAJAS DEL NaOCl

A pesar de su uso frecuente, sólo se han reportado pocos casos de reacciones alérgicas al NaOCl (Caliskan, 1994).

El NaOCl aparenta ser el irrigante ideal, ya que cubre más cantidad de requerimientos que cualquier otro compuesto. Tiene la capacidad única de disolver tejido necrótico y los componentes orgánicos de la capa de deshecho. Mata agentes patógenos organizados en biofilm y en los túbulos dentinarios. (Haikel, 1994).

Otra de sus ventajas es su bajo costo, durabilidad, accesibilidad además de su propiedad de lubricar los conductos (Heling, 2001).

DESVENTAJAS DEL NaOCl

Estudios han revelado que la preparación químico mecánica utilizando NaOCl a diferentes concentraciones no es suficiente para dejar los conductos libres de bacterias, aproximadamente de 40% a 60% de los conductos siguen siendo positivos a la presencia de bacterias (Siqueira and Rocas, 2008).

La principal desventaja del NaOCl es su alta toxicidad. Agregándole a esto su sabor desagradable e incapacidad de eliminar la capa de deshecho (Sundqvist, 1976).

El NaOCl tiene un olor desagradable, causa daño irreversible en la ropa, y es más tóxico que otras soluciones irrigantes. Conforme la concentración aumenta, los efectos tóxicos del NaOCl en tejidos vitales también. De tal manera, que debe realizarse el protocolo de irrigación con mucho cuidado para reducir la posibilidad de causar daño a los tejidos (Safavi et al., 1990).

La complicación más común es la inyección inadvertida del NaOCl a los tejidos periapicales. Entre otras complicaciones se encuentran la inyección a los senos maxilares, perforaciones radiculares laterales, inyección accidental de NaOCl en lugar del anestésico y que caiga solución a los ojos al paciente (Donlan and Costerton, 2002).

La aplicación de extrema presión durante la irrigación o la introducción excesiva de la aguja en el conducto radicular puede resultar en el depósito de irrigante a los tejidos periapicales. En dichos casos, el paciente experimenta dolor muy agudo, rápida inflamación y sangrado de los tejidos periapicales (Rocas et al., 2008).

La inyección intradérmica de NaOCl diluido 1:1, 1:2 y 1:4 produce ulceraciones de piel (Xie et al., 2012). También se reportó, que el NaOCl en concentraciones mayores que 0.01% es letal para los fibroblastos (Heling, 2001).

El uso del aislamiento absoluto es indispensable para el éxito del tratamiento y para proteger al paciente de aspiración, saliva y debris dental (Nair, 2000).

PROTOCOLO SUGERIDO DE IRRIGACIÓN

Una solución de NaOCl debe ser empleada durante la instrumentación, sin alterarlo con el EDTA o ácido cítrico.

Los conductos siempre deben de tener NaOCl. Esto va a incrementar el tiempo de trabajo del irrigante. La eficacia de corte de los instrumentos manuales se mejora y la carga torsional de los instrumentos rotatorios Ni-Ti se reduce en ambientes llenos de fluidos en comparación a medios secos (Yguel, 1990).

Entre instrumentos, los conductos deben ser irrigados utilizando cantidades copiosas de NaOCl (Hülsmann, 2003).

Una vez que el proceso de conformación ha sido completado, los conductos pueden ser irrigados usando EDTA o ácido cítrico.

Generalmente, cada conducto se irriga por lo menos 1 minuto usando de 5 a 10 ml del agente quelante (Calt and Serper, 2002).

El tiempo de trabajo necesario para obtener la completa remoción de la capa de desecho es de 2-3 min. o más. (Di Lenarda et al., 2000).

La elección del irrigante final depende del siguiente paso en el tratamiento, ya sea si se planea colocar medicamento intraconducto o no. Si se utiliza hidróxido de calcio, el irrigante final debe de ser el NaOCl, ya que estos dos se complementan perfectamente.

La irrigación debe ser tan frecuente e intensa según la proporción de contaminación del conducto radicular. El volumen de la solución es más importante que la concentración de la sustancia (Zehnder et al., 2003).

CatDex

El CatDex es una molécula poliguanidina catiónica conjugada, cuyo potencial citotóxico ha sido demostrado previamente en distintas líneas de cultivos de células tumorales (Márquez et al., 2004).

Su efecto se ha estudiado *in vitro* utilizando células transicionales de alto grado de carcinomas. (Márquez et al., 2002)

Estudios revelan que es altamente efectivo a bajas concentraciones micromolares, siendo más eficiente que la adriamicina en líneas de células tumorales. (Meurling et al., 2009)

El CatDex, al igual que la clorhexidina (CHX), tiene una estructura semejante con moléculas catiónicas que se unen a grupos aniónicos afectando la proliferación celular; por lo que se han realizado estudios del impacto del CatDex en algunos microorganismos cariogénicos (*S. mutans*, gram-positivo) y periodontopatógenos (*P. gingivalis*, gram-negativo). Bacterias que bien se sabe, la CHX tiene un efecto sobre su desarrollo.

El CatDex tiene un potencial antimicrobiano hacia bacterias patógenas responsables de enfermedades orales. Inhibe el 98% de las bacterias que crecen a concentraciones de 0.012 mM.

Puede ser utilizado como antiséptico a concentraciones entre 0.1 y 0.05 para bacterias solas o en mezcla.

Existe un estudio en el cual se comparó el efecto antibacteriano del CatDex y CHX a 0.05 mM contra *Streptococcus mutans* UA159 y *Porphyromonas gingivalis* W83. En donde muestra una actividad efectiva, prolongada y sostenida durante 8 horas sobre *S. mutants* y menor a este tiempo sobre *P. gingivalis* (Escamilla et al., 2013).

MARCO DE REFERENCIA.

Las soluciones antimicrobianas juegan un papel clave en la erradicación de las bacterias. El rol principal de la irrigación del conducto radicular es colaborar en la muerte de bacterias y la remoción de la biopelícula bacteriana de una superficie sin instrumentar (30%-50%) (Siqueira et al., 2002).

A pesar de que la instrumentación y el uso de las soluciones irrigantes matan a la mayoría de las células microbianas en el sistema de conductos, se ha demostrado que una pequeña parte de la flora sobrevive (Prabhakar et al., 2010).

En un estudio de Ricucci y Siqueira en el 2010, evaluaron la prevalencia intraradicular y extraradicular de conductos con periodontitis apical, tratados, encontrando cepas bacterianas en el segmento apical de 77% de ellos.

La eliminación de los mecanismos involucrados en la resistencia bacteriana al tratamiento requieren la investigación *in vitro* de las especies bacterianas y su interacción. Además del efecto de los agentes antimicrobianos sobre ellas (Abdullah et al., 2005).

Lana et al., 2001, encontraron un 81.5% de conductos infectados que mostraban una infección polimicrobiana. Un 88.9% eran bacterias anaerobias estrictas, 51.8% anaerobias facultativas, 18.5% microaerofílicas y 7.4% hongos.

Las bacterias anaerobias facultativas representan un grupo importante que actúan sinérgicamente con bacterias anaerobias y tienen un papel fundamental en la colonización de los conductos radiculares.

Especies de *Prevotella*, especialmente *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae* y *P. denticola* también han sido comúnmente aisladas en infecciones de origen endodóntico.

P. intermedia es una bacteria anaerobia frecuentemente aislada en conductos radiculares infectados y es responsable de síntomas agudos (Berkiten et al.,

2001).

Bae *et al.*, 1997, coinciden con este planteamiento y señalan que cepas identificadas como *P. intermedia* han sido separadas en 2 cepas distintas: *P. intermedia* y *P. nigrescens*. En este estudio de 56 cepas, 41 (73.2%) fueron identificadas como *P. nigrescens* y 15 (26.8%) como *P. intermedia*, lo que confirma que son las bacterias pigmentadas de negro aisladas más a menudo en infecciones de origen endodóntico.

El efecto de la mayoría de los irrigantes utilizados en endodoncia ha sido ampliamente probado contra bacterias planctónicas. Sin embargo las bacterias en biopelícula son hasta mil veces más resistentes (Siqueira *et al.*, 2000).

Como consecuencia, los estudios recientes pretenden evaluar el efecto de los irrigantes en contra de grupos bacterianos. Los estudios en células planctónicas no imitan las condiciones *in vivo* de los microorganismos ya que éstos se encuentran adheridos entre sí y al conducto radicular (Chávez *et al.*, 2007)

El irrigante ideal debe de tener amplio espectro antimicrobiano y gran eficacia contra varios microorganismos; no ser tóxico sistemáticamente ni cáustico para los tejidos periodontales. A pesar de que los regímenes actuales de irrigación utilizando NaOCl muestran una excelente actividad antimicrobiana, efectos adversos con frecuencia son reportados. Existe la necesidad de agentes irrigantes que tengan buen efecto antibacteriano y no causen daño al paciente (Clegg *et al.*, 2006).

Nair en el 2004, demostraron que el 88% de los conductos radiculares de molares mandibulares tuvieron infección residual en las raíces mesiales, después de ser instrumentadas e irrigadas con NaOCl. Por este tipo de limitaciones continúa la búsqueda de un mejor irrigante.

El gluconato de clorhexidina (CHX) es un irrigante de amplio espectro antimicrobiano comparable al del NaOCl. Sin embargo, puede dar lugar a la actividad residual de los antibióticos en la superficie de dentina después de la

exposición prolongada del conducto radicular (Onçağ *et al.*, 2003).

Se han realizado estudios comparando los efectos antimicrobianos del NaOCl y de la CHX en contra de biopelículas de *E. faecalis*.

Kuruvilla and Kamath, 1998, tuvieron como propósito comparar la eficacia antimicrobiana de la CHX al 2% y el NaOCl al 5.25%, en el cual, el número de cultivos positivos fue mayor para la clorhexidina, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Otro estudio similar realizado por Ozok *et al.*, 2007, probó el efecto antimicrobiano del NaOCl y CHX a diferentes concentraciones en contra de los microorganismos encontrados con mayor frecuencia en los conductos radiculares

Carson *et al.*, 2005, en su investigación, compararon la actividad antimicrobiana de NaOCl al 6% y 3%, CHX al 2.0% y 0.12% en *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus sanguis*, y *Lactobacillus acidophilus*.

El tiempo de contacto y la concentración del NaOCl fue analizado en un estudio donde variaba de 2 a 30 minutos y de 0.5% a 5.25% para poder remover eficazmente el *E. faecalis* de los túbulos dentinarios. El régimen más efectivo fue 5.25% a 40 minutos (Retamozo *et al.*, 2010).

Giardino *et al.*, 2007, midieron la eficacia antimicrobiana de los irrigantes endodónticos contra biopelículas de *E. faecalis*, y el análisis estadístico mostró que sólo el 5.25% pudo desintegrar y remover la biopelícula.

En la búsqueda del irrigante, ideal se ha comparado el NaOCl con muchas soluciones. Wang *et al.*, 2012, en su investigación, midieron la eficacia desinfectante del NaOCl al 6% y del QMIX en *E. faecalis* en conductos dentinarios mediante CLSM.

Un estudio realizado *in vitro* comparó la acción antimicrobiana del Dermacyn, Biopure MTAD, 2% CHX, y NaOCl al 5.25% contra *E. faecalis*. Mientras que otro estudio muy parecido agregó a la comparación el ácido cítrico (Krause *et al.*, 2007)

En otra investigación se cultivaron biopelículas de cepas de *F. nucleatum* y *P. micros* y se comparó su crecimiento y susceptibilidad al NaOCl a diferentes concentraciones Ozok et al., 2007).

Durante la última década, nuevas tinciones fluorescentes y equipos han sido desarrollados para mejorar los métodos, para separar células vivas de muertas. Un método útil para estimar esto, es utilizar procedimientos de tinciones fluorescentes dependiendo de la viabilidad celular (Shen et al., 2010).

La microscopía confocal para el estudio de biopelículas orales se ha reportado en estudios previos. Una ventaja potencial es la ausencia de deshidratación de la muestra, la cual permite el análisis antes e inmediatamente después del tratamiento antimicrobiano (Bramante et al., 2011).

Wang, Shen et al., 2012, compararon los efectos antibacterianos de diferentes soluciones desinfectantes en biofilms jóvenes y maduros de *E. faecalis* en los conductos dentinarios utilizando un modelo de desinfección dentinaria y microscopía confocal.

En otra investigación se exploró el potencial del CLSM para la identificación *in situ* de bacterias vivas y muertas en túbulos dentinarios. Se logró describir la distribución y vitalidad de la bacteria *E. faecalis* en dentina infectada de origen bovino (Ordinola et al., 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios Metodológicos

El diseño del estudio fue abierto, experimental, prospectivo y longitudinal.

Criterios de Inclusión.

Medio de cultivo: Infusión Cerebro Corazón

Cultivo puro de *Enterococcus faecalis*

Cultivo puro de *Porphyromonas endodontalis*.

Mezcla bacteriana de *Enterococcus faecalis* y *Porphyromonas endodontalis*

Viabilidad celular

Criterios de Exclusión

Ausencia de crecimiento bacteriano de *Enterococcus faecalis*.

Ausencia de crecimiento bacteriano de *Porphyromonas endodontalis*.

Ausencia de crecimiento bacteriano de la mezcla bacteriana.

Criterios de eliminación.

Contaminación de cualquiera de los cultivos bacterianos durante el proceso.

Definición de variables.

Independientes		Dependientes	
Variable	Escala	Variable	Escala
NaOCl CatDex	Intervalo: mL	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i> Mezcla bacteriana	Nominal

Se realizó un análisis de la eficacia antimicrobiana del CatDex a diferentes concentraciones en una mezcla bacteriana de *Enterococcus faecalis* (ATCC 11420) y *Porphyromona endodontalis* proporcionadas por la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del CIDICS, UANL.

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Cultivo Bacteriano

Las cepas utilizadas en este estudio fueron cultivos puros de la American Type Culture Collection (ATCC): *Enterococcus faecalis* (ATCC 11420) y *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 354066). El cultivo y las condiciones de crecimiento de cada bacteria se basó de acuerdo a las especificaciones de las técnicas. *E. faecalis* y *P. endodontalis* fueron subcultivadas a 37°C durante 48 horas en placas de agar con Infusión Cerebro Corazón (ICC, Becton Dickinson Bioxon México) y luego se inocularon a una absorbancia de 600 nm de 0.2 (Thermo Scientific Spectrophotometer Genesys 10UV Scanning Madison, WI-USA) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de caldo de ICC. Las bacterias fueron incubadas durante 10 h y 18 h respectivamente a 37°C hasta que alcanzaron la fase logarítmica (Thermo Scientific Lab-Line Incubator. Iowa, USA). La cepa de *E. faecalis* se cultivó bajo condiciones aeróbicas debido a las características de tolerancia de oxígeno ya que es una bacteria anaeróbica facultativa; mientras que *P. endodontalis* es un microbio anaeróbico y su manejo requiere una atmósfera controlada en la cámara de anaerobeosis (Plas-Labs, Lansing/M.I.) Esta atmósfera tenía una mezcla de H₂ (10%), CO₂ (5%) y N₂ (85%) (Praxair/México). El medio de cultivo y el material utilizado fue pre-esterilizado 15 minutos a 120°C (All American, Hillsville, USA.)

Preparación de conjugado CatDex y estudios de unión

Se realizó la síntesis de conjugado de CatDex como fue descrito previamente por Meurling L. et al, 2009.

Modificación Dextrano. Dextrano 70 PhEUR (Pharmacosomes AS, Dinamarca) se utilizó como columna vertebral del conjugado. El sodio meta-peryodato (MerckAG, Darmstadt Alemania), se utilizó para la oxidación del dextrano (activación). La aminoguanidina (Sigma-Aldrich, Suecia), se utilizó para el acoplamiento. Cianoborohidruro de sodio (Chemicon, Estocolmo, Suecia), se utilizó para la aminación reductora. NAP-5 y PD-10 y columnas desechables Sephadex G-25 fueron utilizados para la separación y purificación (Pharmacia Amersham Biotech AB).

Activación y acoplamiento. Como se ha descrito previamente (20), Dextrano 150 mg se disolvió en 5 ml de agua desionizada. Se añadió ácido sulfúrico concentrado (25 μ l), seguido por 0.120 g de peryodato de sodio. La mezcla de reacción se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 45 min. A continuación, se añadió acetato de sodio 0.2 mol l⁻¹ l y valoró a un pH 6.5. Se añadió aminoguanidina (160 mg) y se disolvió. La mezcla se incubó por agitación suave durante 240 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Entonces se añadió cianoborohidruro de sodio 20 mg en 0,1 mol l⁻¹ de NaOH y se mezcló. La solución se incubó por agitación suave durante 60 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Después de la incubación, la solución se purificó en una columna PD-10, utilizando 100 mmol l⁻¹ de acetato de sodio pH 6,5 como eluyente.

Cinética de crecimiento

Para iniciar la cinética de crecimiento se debe conocer la concentración celular deseada (células/mL) para un volumen conocido. La concentración deseada debe medirse mediante microscopía y en su equivalente por absorbancia con la ayuda

de un lector de espectrofotometría con luz visible. Para el estudio aquí presentado se usa una absorbancia de 0.2 en la escala de McFarland a una longitud de onda de 600nm.

La fórmula a seguir para saber la cantidad a inocular es:

$$V_1 * C_1 / V_2 * C_2$$

Donde:

V₁: Volumen conocido

C₁: Concentración celular deseada

V₂: Diluciones totales realizadas de la concentración celular

C₂: Concentración celular medida (microscopía/espectrofotómetro)

Luego de realizar adecuadamente las activaciones de las bacterias y lograr un crecimiento y desarrollo favorable mediante su precultivo, se procede a iniciar el ensayo correspondiente a la cinética de crecimiento de cada bacteria.

Las curvas de crecimiento para cada bacteria se efectuaron por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 200 mL de medio de cultivo. Desde su inoculación para el tiempo cero se fue monitoreando el desarrollo celular en intervalos de tiempo determinados de 2 horas, puesto que para algunas bacterias el crecimiento es más rápido con respecto a otras. A fin de tener la mayor parte de los puntos representativos de la cinética, se realizaron cultivos a una hora muy temprana del día y posteriormente a otra hora por la tarde/noche.

Durante cada toma de muestra de 2 mL, se monitoreó el pH del cultivo con un potenciómetro (Denver Instruments, Ultrabasic, USA), la concentración celular (células/mL) y la densidad óptica (DO_{600nm}) .

Concentración mínima inhibitoria (MIC)

Hemos utilizado el método de concentración mínima inhibitoria como indicador para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a compuestos antimicrobianos, esta técnica se considera como el "estándar de oro" (Andrews, 2001). El control positivo utilizado para este estudio fue el NaOCl (CLORALEX) con un peso molecular de 74,44 g/mol. En esta presentación, el NaOCl comercialmente viene al 5.25% (705 mM). Para el estudio, se utilizó directo en dilución de 1:2 (2,62%) (351 mM), y de 1:4 (1.31%) (175 mM). El intervalo de concentraciones para CatDex se encuentra preparado a 1,0 mM (70 mg/L), dicho de otra manera al 1%. El control negativo fue una solución salina constituido por 9% de NaCl (peso/volumen)

El procedimiento se realizó en condiciones estériles en gabinetes de bioseguridad (Clase II, Tipo A2. Kansas, EE.UU.) por triplicado.

Los inóculos de *E. faecalis* y *P. endodontalis* se cultivaron previamente como se ha descrito durante 12 h y 18 h respectivamente, hasta que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento logarítmico. Una concentración de bacterias entre 10^7 - 10^8 células/mL (turbidez a un estándar McFarland 0,5 (Audrey Wanger et al, 1995). *P. endodontalis* se incubó en atmósfera anaerobia, mientras que *E. faecalis* bajo condiciones aeróbicas, ambos a 37 °C durante 24 horas. La manipulación de los componentes a los tubos de ensayo, se efectuó en el siguiente orden: 1) caldo ICC, 2) molécula de interés (CatDex), 3) NaCl (al 9%) y 4) bacteria. La MIC para cada bacteria fue hecha por triplicado. El análisis de datos se realizó cualitativamente observando la presencia o ausencia de turbidez en tubos de ensayo y cuantitativamente; mediante la medición de pH y la absorbancia (600 nm).

Método de Difusión de Disco

La sensibilidad de *E. faecalis* y *P. endodontalis* al CatDex, fue determinada por el método de Kirby-Bauer (Bauer et al, 1966; Aw Bauer, 1959). El cultivo de bacterias se preparó en las mismas condiciones hasta que se alcanzó la fase de crecimiento exponencial. Se sembraron 100 μ L de cada bacteria sobre placas de agar ICC. Un disco de papel de filtro (6 mm) (No.40, Whatman. Piscataway, NJ, EE.UU.), se le colocó 20 μ L de CatDex a diferentes concentraciones. Una solución salina se utilizó como control negativo. Las placas de Petri fueron marcadas por divisiones en el exterior. Las placas ya sembradas y con los discos se incubaron a 37 °C durante 24 h como los requisitos de crecimiento de las bacterias.

En primera instancia se realizaron los antibiogramas para cada una de las bacterias del estudio, y posteriormente se inocularon en simultáneo haciendo una suspensión de ambas bacterias. El análisis realizado consistió en medir con un vernier la zona de inhibición formada o ausente alrededor de los discos y los resultados se presentan en milímetros (mm). Cada concentración se realizó por triplicado.

Todos los experimentos realizados en este estudio se efectuaron por triplicado, y los resultados graficados son el promedio de las repeticiones con su respectiva desviación estándar (DE).

RESULTADOS

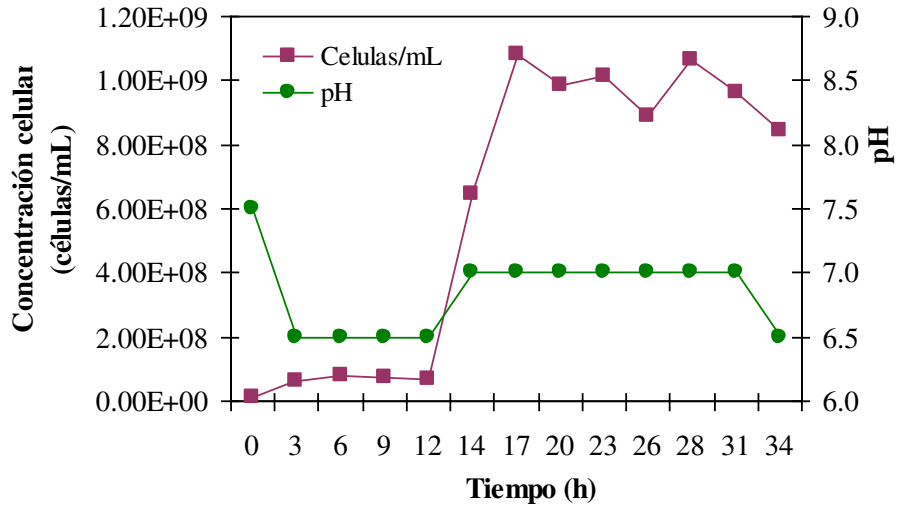
Cinética de Crecimiento

Antes de someter a las bacterias a cualquier tipo de experimentación bajo condiciones diversas de crecimiento, es importante conocer sus características de crecimiento en los medios de cultivo típicos.

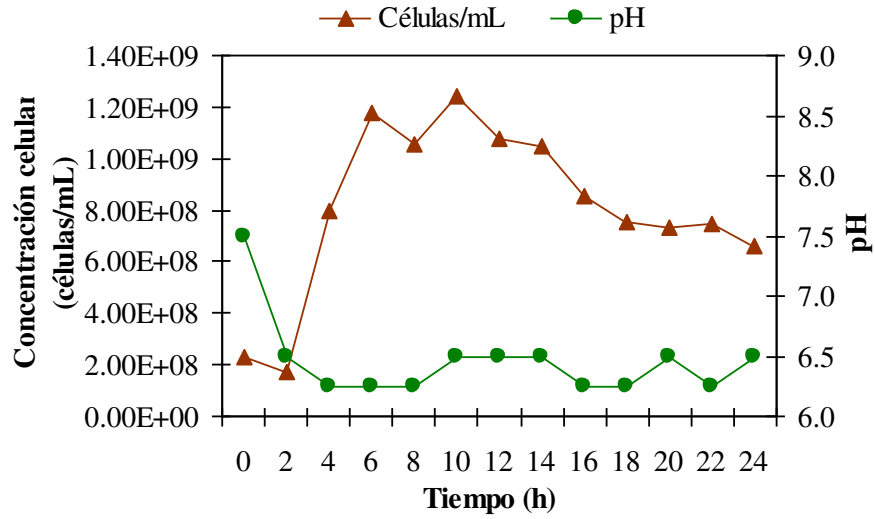
Cada bacteria muestra diferente tipo de crecimiento dependiendo de varios factores como el metabolismo, temperatura y ambiente que cada uno requiere para su desarrollo.

La bacteria *Porphyromonas endodontalis* presentó su máximo punto de crecimiento de fase exponencial a las 17 horas (Gráfica 1) con una Abs_{600nm} de 2.16 (± 0.14), correspondiente a una concentración celular de 10.8×10^8 (± 7.07) células/mL y un pH de 7.0 (± 0.0). Mientras que la etapa de mayor crecimiento para *Enterococcus faecalis* fue de 10 horas (Gráfica 2), con valores de 2.15 (± 0.45), 12.4×10^8 células/mL y un pH 6.5 (± 0.0) respectivamente.

Estos resultados son básicos y de suma importancia para realizar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y el Método de Difusión de Disco, ya que de esta manera se puede basar en una fuente de crecimiento celular equitativo entre las bacterias patógenas con un metabolismo en su máxima expresión (virulencia).



Gráfica 1. Cinética de Crecimiento de *Porphyromonas endodontalis*



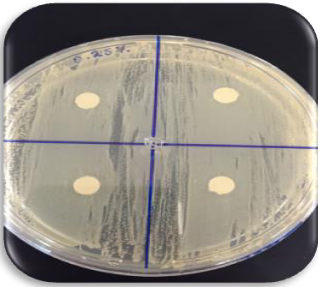
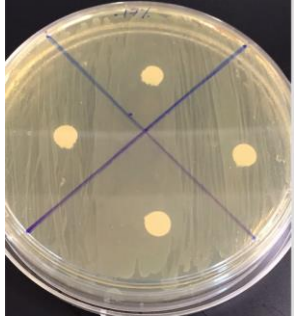
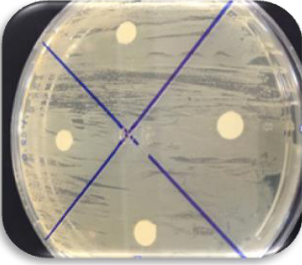
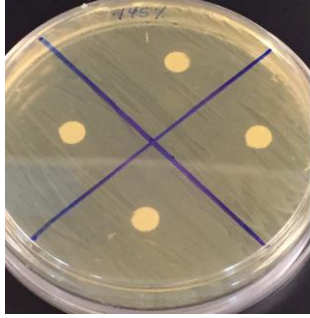
Gráfica 2. Cinética de Crecimiento de *Enterococcus faecalis*


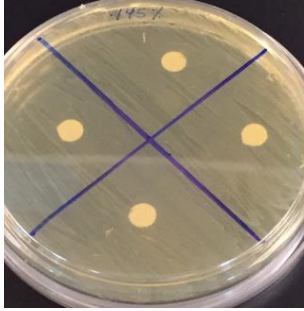
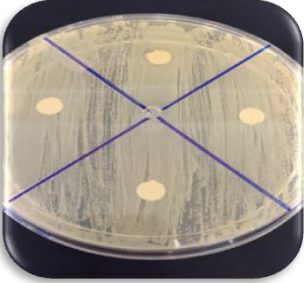
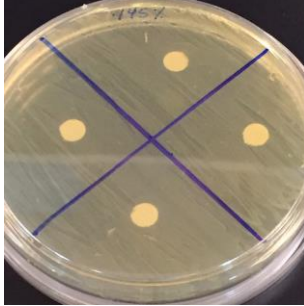
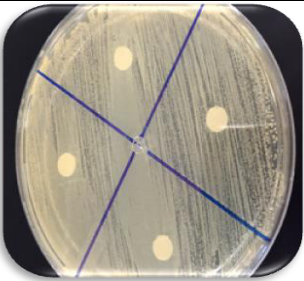
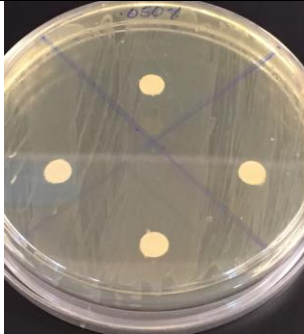
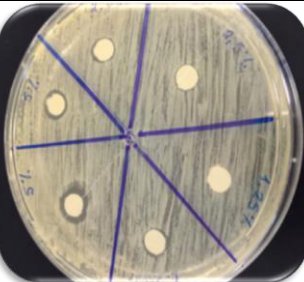
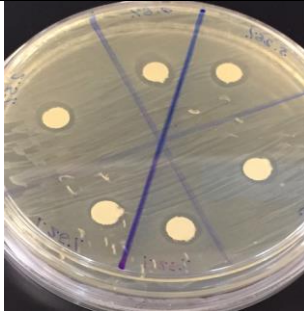
Método de Difusión de Disco

Halo de Inhibición

La evaluación de los resultados se efectuó mediante la formación de halos de inhibición alrededor del disco y comparando entre los controles positivo (NaOCl) y negativo (agua), con respecto a las bacterias de interés. Los resultados fueron interpretados en tanto que la sensibilidad fue expresada por la bacteria al contacto con el agente antimicrobiano de estudio. La zona o halo de inhibición es diferente para cada bacteria.

a) Tabla 1. Halos de inhibición para *P. Endodontalis* y *E. faecalis*

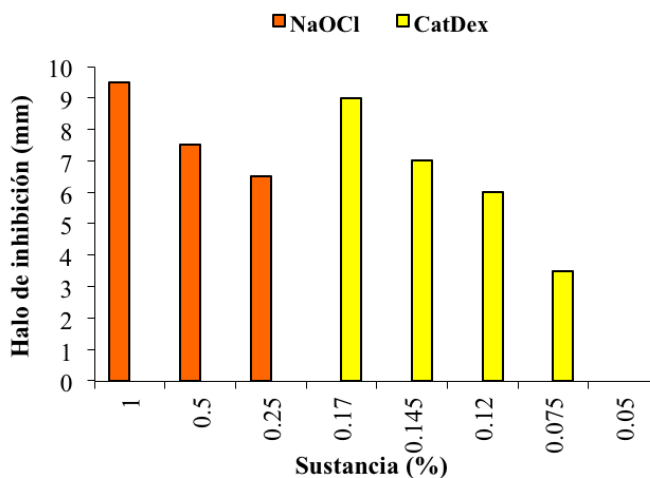
SUSTANCIA	CONCENTRACION	<i>P. endodontalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CatDex	0.17%		
CatDex	0.145%		

CatDex	0.12%		
CatDex	0.075%		
CatDex	0.05%		
NaOCl	5.25%, 2.5% 1.5%		

En la Gráfica 3 se observa el efecto que tuvieron el CatDex y el NaOCl a diferentes concentraciones frente a la bacteria *Porphyromonas endodontalis*. Se puede observar que para *P. endodontalis* hay un efecto antimicrobiano positivo mayor ante el NaOCl al 5.25%, impidiendo el crecimiento de la bacteria. El

diámetro del halo de inhibición formado para cada dosis, fue de 9.5 mm (± 0.70), 7.5 mm (± 0), y 6.5 mm (± 0) respectivamente.

Se aprecia claramente que con el CatDex el efecto máximo se logra a la concentración de 0.17%. En donde el diámetro del halo fue de 9 mm (± 0), 7 mm (± 0) y 6 mm (± 0).

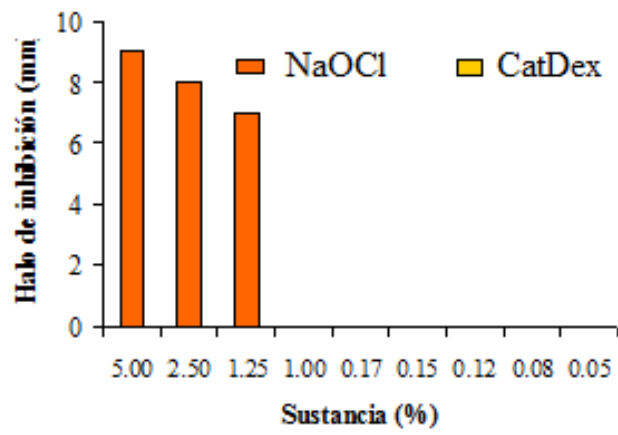


Gráfica 3. Antibiograma de *Porphyromonas endodontalis*

En la gráfica 4 se observa el efecto que tuvieron el CatDex y el NaOCl a diferentes concentraciones frente a la bacteria *Enterococcus faecalis*, lo cual nos permite determinar ante que concentración es más sensible esta bacteria.

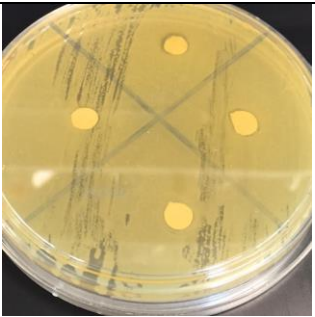
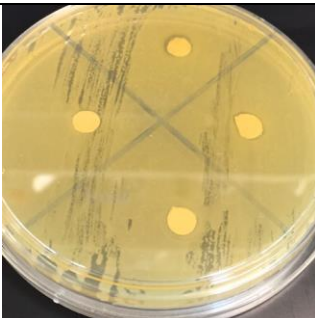
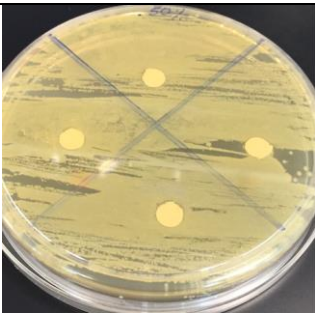
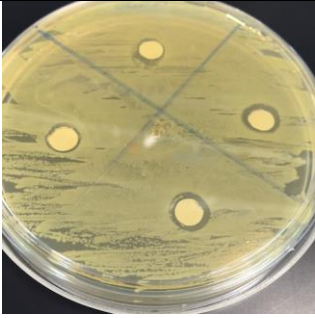
Se puede observar que para esta bacteria hay un efecto antimicrobiano positivo mayor ante el NaOCl al 5.25% 2.5% y al 1.25%. El diámetro del halo de inhibición formado para cada dosis, fue de 9 mm (± 0.0), 8 mm (± 0.0), y 7 mm (± 0.0) respectivamente.

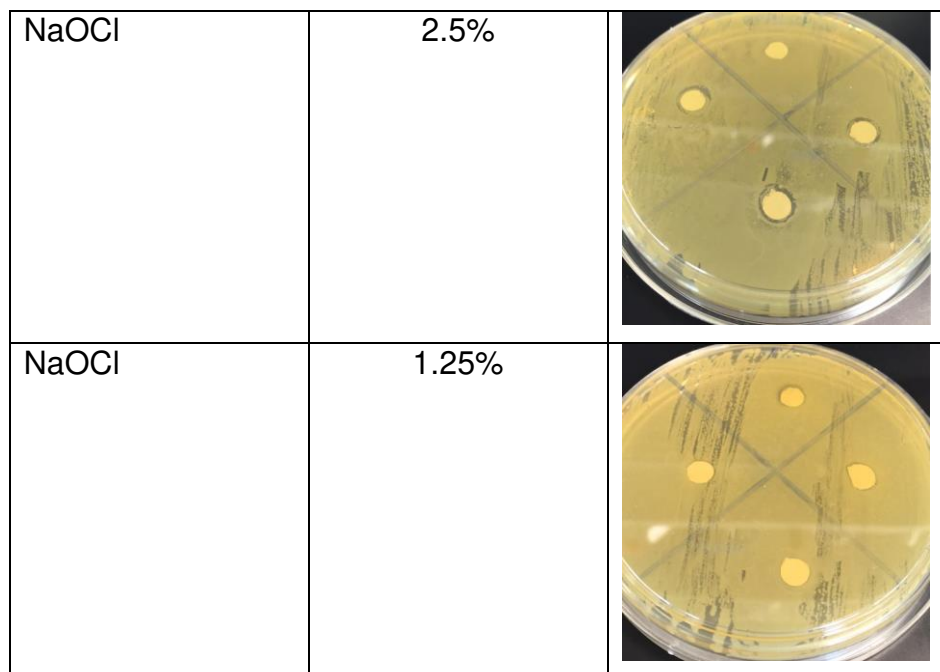
La bacteria muestra una resistencia ante el CatDex.



Gráfica 4. Antibiograma de *Enterococcus faecalis*

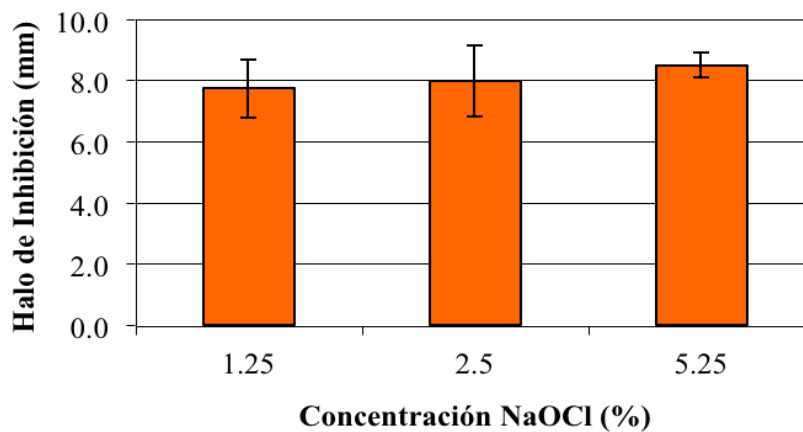
b) Tabla 2. Halo de inhibición para mezcla bacteriana de *P. endodontalis* y *E. Faecalis*.

Sustancia	Concentración	Mezcla Bacteriana
CatDex	1%	
CatDex	0.5%	
CatDex	0.25%	
NaOCl	5.25%	

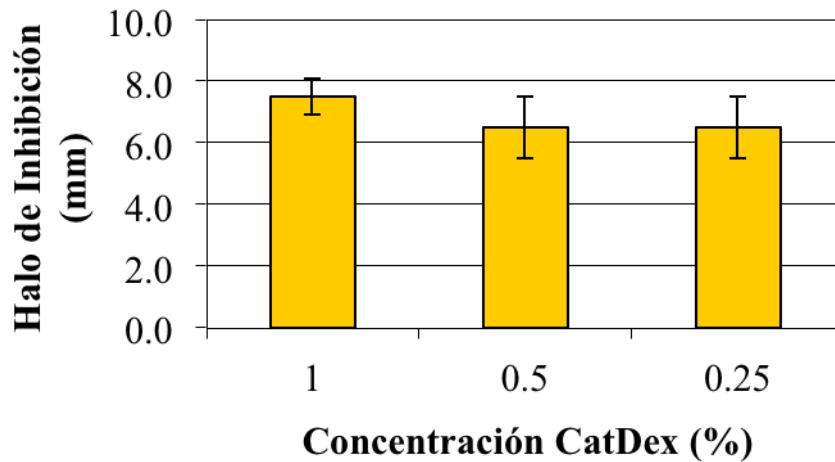


En la gráficas 5 y 6 se observa la eficacia o el efecto que tuvieron el CatDex y el NaOCl a diferentes concentraciones en la mezcla bacteriana de *Enterococcus faecalis* y *Porphyromonas endodontalis*, ambas en fase logaritmica de crecimiento, lo cual nos permite determinar ante que concentración fueron más sensibles. Se puede observar que hay un efecto antimicrobiano positivo mayor ante el NaOCl al 5.25% de 8.5 mm (± 0.50) mientras que a concentraciones de 2.5% y 1.25% los halos de inhibición formados fueron de 8 mm (± 0) , y 7.5 mm respectivamente. (± 0)

Para el CatDex la mayor sensibilidad se obtuvo al 1% con un halo de inhibición de 7.5mm (± 0.58) mm; al 0.5% de 6.75mm (± 0.96) y al 0.25% de 6.25 mm (± 0.50).



Gráfica 6. Antibiograma NaOCl Mezcla Bacteriana

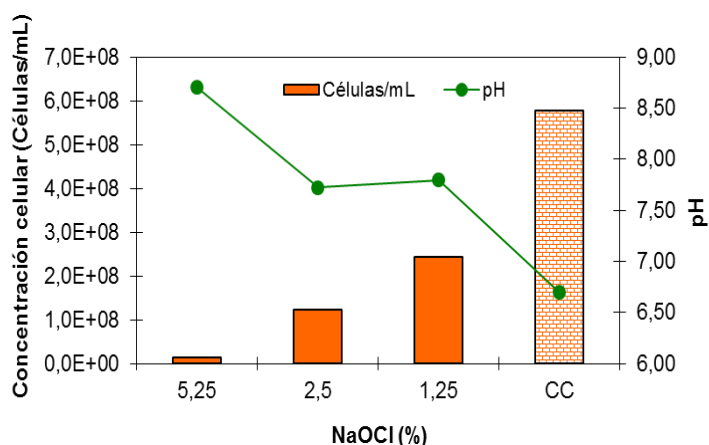


Gráfica 5. Antibiograma CatDex Mezcla Bacteriana

Concentración Mínima Inhibitoria

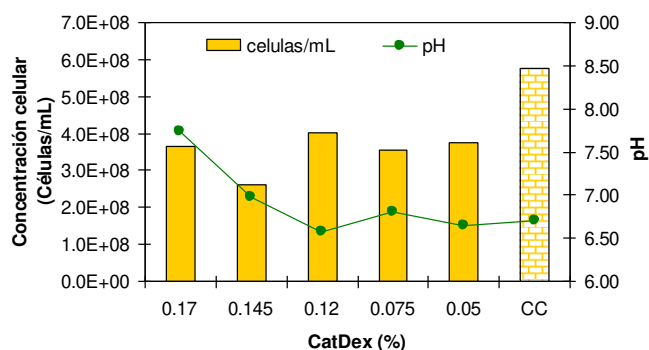
Para el control de crecimiento de *P. endodontalis* después de 24 horas de incubación fue de 5.78×10^8 ($\pm 6.85 \times 10^7$), Abs_{600nm} 1.36 (± 0.42), y pH de 8 (± 0.0).

Con el NaOCl la mayor reducción se observó al 5.25% (Gráfica 7) con 1.45×10^7 cel/ml ($\pm 9.23 \times 10^6$), Abs_{600nm} 0.029 (+0.0), y PH de 8 (± 0.0) .



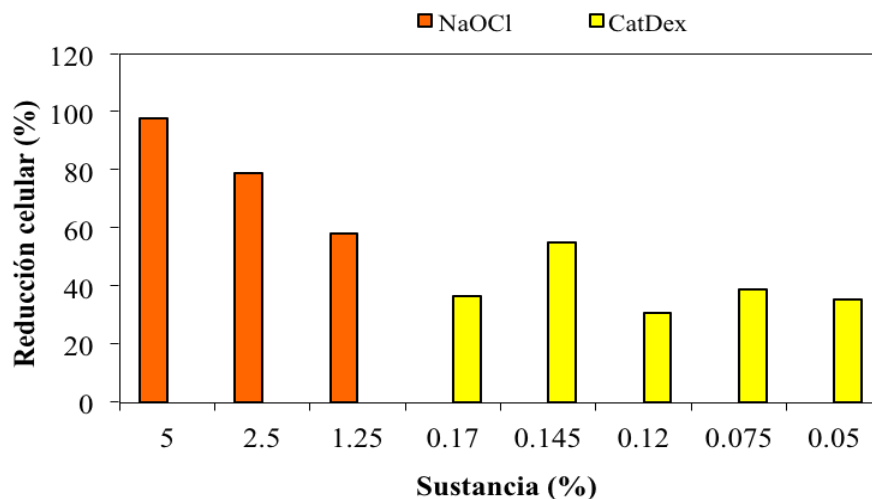
Gráfica 7. Concentración Mínima Inhibitoria NaOCl *P. Endodontalis*

Con el CatDex la mayor reducción se observó a la concentración de 0.145% con una concentración celular de 2.6×10^8 ($\pm 4.38 \times 10^8$) , Abs_{600m} 1.100 (± 0.376) y PH de 7 (± 0.6) (Gráfica 8)



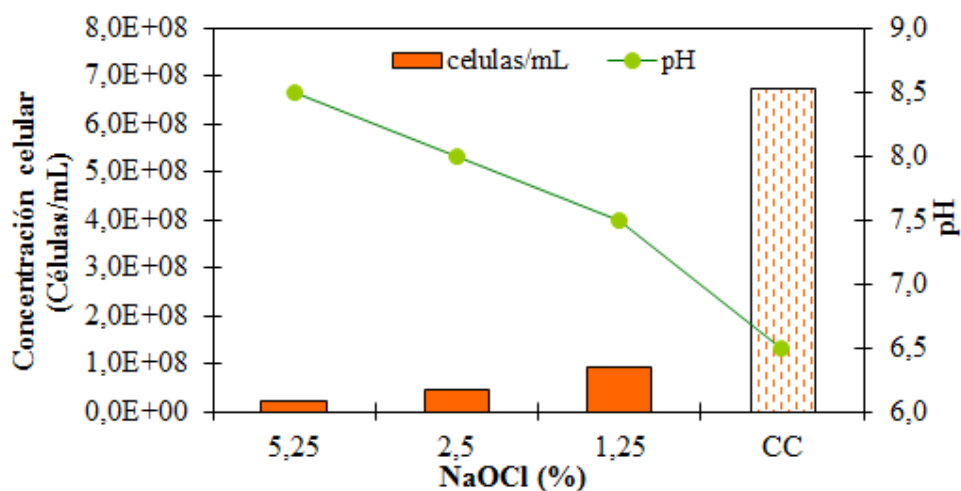
Gráfica 8. Concentración Mínima Inhibitoria CatDex. *P. Endodontalis*

En resumen, el porcentaje de reducción bacteriana para *Porphyromonas endodontalis* con el NaOCl fue de 97.8% al 5.25%, 78.73 % al 2.5% y 57.9% al 1.25%. Mientras que para el CatDex al 0.145% fue de 55% (Gráfica 9).



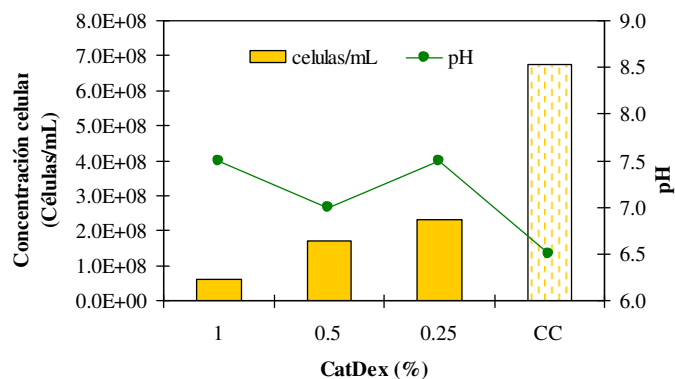
Gráfica 9. Porcentaje de Reducción Bacteriana *Porphyromonas Endodontalis*

Para el control de crecimiento de *E. faecalis* después de 24 horas de incubación fue de 6.74×10^8 cel/ml ($\pm 6.67 \times 10^7$), Abs_{600nm} 1.34 (± 0.13), y pH de 6.5 (± 0.0). Con el NaOCl la mayor reducción obtenida fue al 5.25%, con 9.04×10^7 cel/ml ($\pm 5.58 \times 10^7$), Abs_{600nm} 0.18 ($+0.1 \times 10^8$), y pH de 8.5 (Gráfica 10).



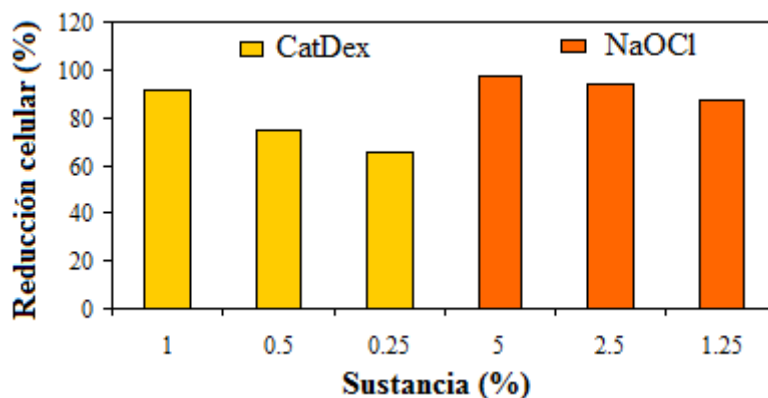
Gráfica 10. Concentración Mínima Inhibitoria NaOCl. *Enterococcus Faecalis*

Con el CatDex la mayor reducción se observó al 1% (Gráfica 11) con 6.1×10^7 ($\pm 2.5 \times 10^7$), Abs_{600nm} 0.149 (± 0.381), y 7.5 de PH (± 0.0).



Gráfica 11. Concentración Mínima Inhibitoria CatDex. *Enterococcus Faecalis*

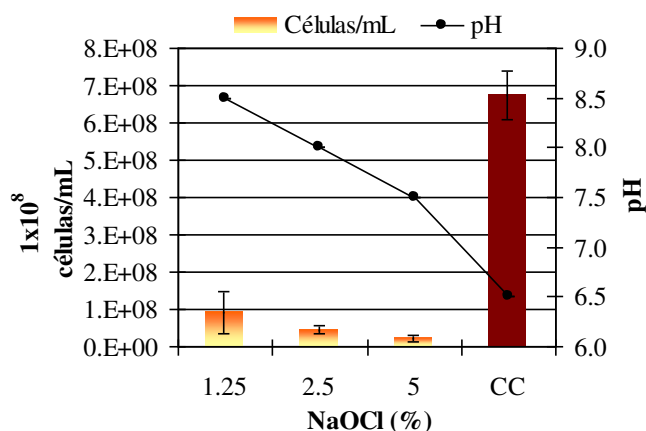
En resumen, el porcentaje de reducción bacteriana para *Enterococcus faecalis* con el NaOCl fue de 96.9% al 5.25%, 93.3 % al 2.5% y 86.584% al 1.25%. Mientras que para el CatDex al 1% fue de 90.8% , 74.7% al 0.5% y 62.4% al 0.25%.(Gráfica 12).



Gráfica 12. Porcentaje de Reducción Bacteriana *Enterococcus Faecalis*

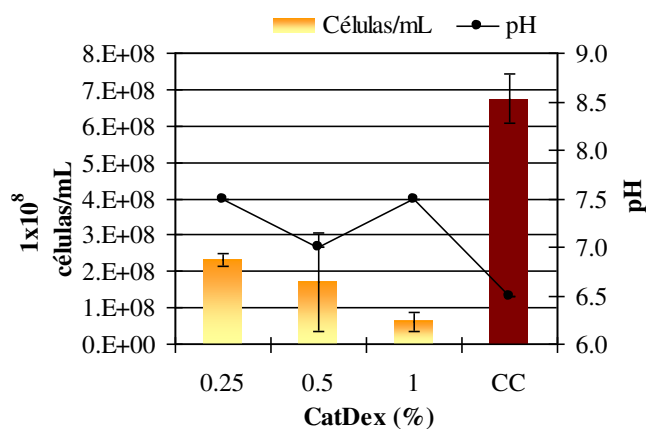
En cuanto a la mezcla bacteriana el control de crecimiento después de 24 horas de incubación fue de $6.74 \times 10^8 (\pm 6.67 \times 10^7)$ Abs_{600nm} 1.34 (± 0.13), y PH de 6.5 (± 0.0).

Con el NaOCl la máxima reducción se observó al 5.25% con 9.5×10^7 cel/ml ($\pm 5.59 \times 10^7$) Abs_{600nm} 0.18 (± 0.11), y pH de 7.5 (± 0.0). (Gráfica 13)



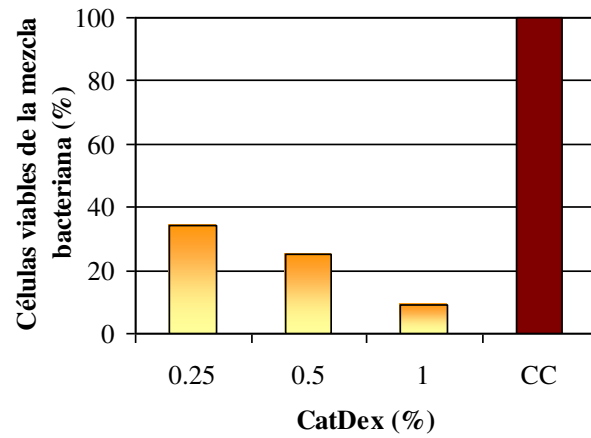
Gráfica 13. Concentración Mínima Inhibitoria NaOCl. Mezcla Bacteriana

El CatDex tuvo su máxima eficacia sobre la mezcla bacteriana al ser utilizado al 1% (Gráfica 14) con 6.14×10^7 cel/ml ($\pm 2.51 \times 10^7$), Abs_{600nm} 0.149 (± 0.35), y 7.5 de PH (± 0.0).

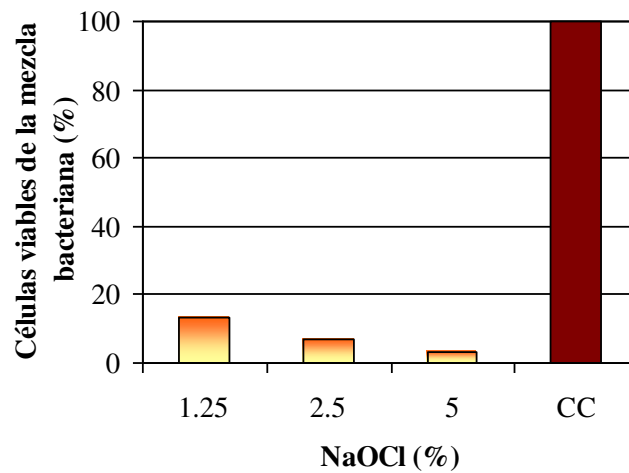


Gráfica 14. Concentración Mínima Inhibitoria CatDex. Mezcla Bacteriana

Resumiendo que en la mezcla bacteriana el CatDex al 1% logró una reducción celular del 90%, mientras que el NaOCl% el 99%. (Gráficas 15 y 16)



Gráfica 15. Porcentaje de Reducción celular. Mezcla Bacteriana



Gráfica 16. Porcentaje de Reducción celular. Mezcla Bacteriana

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

<i>P. endodontalis</i> MIC (cel/ml)					
CatDex	CatDex	CatDex	NaOCl	NaOCl	NaOCl
0.17%	PROMEDIO	3.6 x 10 ⁸	5.25%	PROMEDIO	0.14 x 10 ⁸
	DESV.	0.52 x 10 ⁸		DESV.	0.092 x 10 ⁸
	ESTANDAR			ESTANDAR	108
0.15%	PROMEDIO	2.6 x 10 ⁸	2.50%	PROMEDIO	2.4 x 10 ⁸
	DESV.	4.38 x 10 ⁸		DESV.	1.8 x 10 ⁸
	ESTANDAR			ESTANDAR	
0.12%	PROMEDIO	4.01 x 10 ⁸	1.25%	PROMEDIO	0.12 x 10 ⁸
	DESV.	0.25 x 10 ⁸		DESV.	1.0 x 10 ⁸
	ESTANDAR			ESTANDAR	
0.08%	PROMEDIO	3.5 x 10 ⁸			
	DESV.	0.19 x 10 ⁸			
	ESTANDAR				
0.05%	PROMEDIO	3.7 x 10 ⁸			
	DESV.	0.79x10 ⁸			
	ESTANDAR				

	<i>P. endodontalis</i>		
	NaOCl	NaOCl	NaOCl
CatDex	5.25	2.50	1.25
0.170	0.0003437	NS	0.0058946
0.150	NS	NS	NS
0.125	0.0000148	NS	0.0028305
0.075	0.0000103	NS	0.0045313
0.050	0.0014915	NS	0.0082458

<i>E. faecalis</i> MIC (cel/ml)					
CatDex	CatDex	CatDex	NaOCl	NaOCl	NaOCl
1.00%	PROMEDIO	0.61 X 108	5.25%	PROMEDIO	0.9 X 108
	DESV.	0.25 X 108		DESV.	0.55 X 108
	ESTANDAR			ESTANDAR	
0.50%	PROMEDIO	1.6 X 108	2.50%	PROMEDIO	0.45X 108
	DESV.	0.13 X 108		DESV.	0.11X 108
	ESTANDAR			ESTANDAR	
0.25%	PROMEDIO	2.3 X 108	1.25%	PROMEDIO	0.21X 108
	DESV.	0.17 X 108		DESV.	0.68 X 108
	ESTANDAR			ESTANDAR	

	<i>E. faecalis</i>		
	NaOCl	NaOCl	NaOCl
CatDex	5.25	2.50	1.25
1.00	NS	NS	NS
0.50	NS	0.0000932	0.006676967
0.25	NS	0.0003055	0.015469941

<i>Mezcla</i> MIC (cel/ml)					
	CatDex	CatDex	NaOCl	NaOCl	NaOCl
1.00%	PROMEDIO	0.61 x 108	5.25%	PROMEDIO	0.25 x108
	DESV.			DESV.	0.068x108
	ESTANDAR			ESTANDAR	
0.50%	PROMEDIO	1.7x108	2.50%	PROMEDIO	0.45 x 108
	DESV.	1.4 x 108		DESV.	0.116x108
	ESTANDAR			ESTANDAR	
0.25%	PROMEDIO	2.3 x 108	1.25%	PROMEDIO	0.905 x 108
	DESV.			DESV.	0.559 x 108
	ESTANDAR	0.18x108		ESTANDAR	108

	Mezcla		
	NaOCl	NaOCl	NaOCl
CatDex	5.25	2.50	1.25
1.00	0.0738 (NS)	NS	NS
0.50	NS	NS	NS
0.25	0.0000507	0.000116196	0.014680048

En base a los resultados Estadísticos obtenidos del efecto antimicrobiano del CatDex y el NaOCl al 5.25% con *Porphyromonas endodontalis*, el NaOCl es mayor que el CatDex en todas las concentraciones evaluadas a excepción del 0.145%. La comparación del NaOCl al 2.25%, no fue estadísticamente significativa a ninguna concentración utilizada de CatDex.

Con *Enterococcus faecalis* la diferencia del el efecto antimicrobiano del CatDex al 1% contra el NaOCl al 5.25% no es significativa. Cuando este se comparó frente al NaOCl al 2.5% y al 1.25% es significativa a las concentraciones de 0.5% y 0.25%.

En la mezcla bacteriana la diferencia en el efecto antimicrobiano del CatDex al 0.25% fue significativa frente al NaOCl a las tres concentraciones. Mientras que con el CatDex al 1% y al 0.5% no fue significativa.

La prueba utilizada fue la de Wilcoxon con un 95% de confiabilidad.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó in vitro la actividad antimicrobiana del CatDex y se comparó con el NaOCl frente a una mezcla bacteriana de *Enterococcus faecalis* y *Porphyromonas endodontalis* para ser utilizados como irrigantes en la terapia endodental.

En el desarrollo del procedimiento se analizó el comportamiento de las moléculas a diferentes concentraciones mediante el Método de Difusión de Disco y la Concentración Mínima Inhibitoria, frente a las bacterias a estudiar de manera independiente en su fase exponencial y posteriormente en la mezcla bacteriana.

Los medios de cultivo utilizados fueron Infusión Cerebro Corazon en agar para el método de difusión de disco (Salles et al., 2015) (Kim et al., 2015); y este mismo en caldo para la prueba de concentración mínima inhibitoria como lo reportan en su metodología diferentes artículos en la literatura actual. (Tuncay et al., 2015) (Ravi et al., 2015)

El CatDex es una molécula nunca antes reportada en estudios de irrigación en endodoncia. Sin embargo Escamilla y colaboradores, en sus estudios demostraron que frente a microorganismos orales como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivales* su efecto antibacteriano era eficaz al ser utilizado a concentraciones por debajo de 0.12%. (Escamilla et al., 2013)

Estos resultados no coinciden con los obtenidos en este trabajo ya que *E. Faecalis* no mostró sensibilidad al CatDex mientras que *P. endodontalis* si a concentraciones por encima del 0.12%.

Kim y colaboradores en el 2015, también obtuvieron resultados discrepantes de la difusión en disco y la prueba de caldo antibacteriano, al probar con MTA-Angelus y Endocem MTA frente a distintas bacterias orales. Ambas pruebas

revelaron que la bacteria más resistente era *E. faecalis*, que no era susceptible en absoluto, en la prueba de difusión en disco. (Kim et al., 2015)

Esto se debe a que los microorganismos utilizados en el presente estudio son mucho más virulentos y resistentes. *E. Faecalis* es un microorganismo comúnmente observado en las infecciones endodónticas persistentes o infecciones secundarias intrarradiculares asociadas con el fracaso del tratamiento endodóntico. (Charles et al, 2006; Evans et al., 2002) Mientras que *P. endodontalis*, está más asociado con tratamientos de conductos que tienen infecciones endodónticas primarias, aunque se observa que coloniza en conductos con ambos tipos de infecciones. (Hong et al., 2015)

La concentración mínima inhibitoria de CatDex encontrada para *P. endodontalis* fue de 0.15%, y de 1% para *E. Faecalis* y la mezcla. Resultados que contrastan con la literatura que menciona que para *S. mutans* y *P. gingivales* la concentración mínima inhibitoria del CatDex es de 0.05 mM. (Dra. Erandi)

En este caso, ambas bacterias mostraron una sensibilidad al control positivo utilizado (NaOCl), el cual ha sido utilizado como el irrigante de elección durante mucho tiempo a diferentes concentraciones (0.5-5.25%) durante la instrumentación. (Yamashita et al., 2003)

En el presente trabajo, la concentración más eficaz para ambas bacterias, y la mezcla de ellas, fue al 5.25%; coincidiendo con múltiples publicaciones en las que ha demostrado la mayor zona de inhibición contra *E. faecalis* considerándose como estándar de oro. (Karkare et al., 2015)

En cuanto a la reducción que logró el hipoclorito de sodio al 5.25% del *E. faecalis*, del 96%. En estudios similares los resultados reportan una reducción mayor al 50%. (Díaz et al., 2014) La proporción de eliminación de microorganismos con estudios realizados por Giardino y col. en el 2007 (20), donde demostraron que el hipoclorito de sodio al 5.25% era altamente eficaz en la erradicación de colonias

de *E. faecalis*. Estos resultados son consistentes con trabajos publicados anteriormente utilizando diferentes metodologías (16,17,21). En un estudio publicado, donde se comparó el efecto antimicrobiano del NaOCl y el MTAD frente a esta bacteria, ambos lograron una eliminación significativa de la mayoría de las UFC de *E. Faecalis*.

El potencial antimicrobiano del NaOCl al 2.5% también ha sido analizado a distintas concentraciones frente a *p. Endodontalis* en donde ha sobresalido por su capacidad de reducir de manera significativa la presencia de colonias bacterianas en conductos radiculares. (Rocas et al., 2011)

En esta investigación el NaOCl al 2.5% logró una reducción celular del 60% con *P. endodontalis*. A diferencia del estudio realizado por Sena et al., 2006 en donde el NaOCl eliminó al 100% las colonias bacterianas de esta bacteria.

Por otra parte, el efecto antibacteriano con *E. Faecalis* fue por encima del 90%, lo cual coincide con la investigación realizada por Kapdan et al., 2015 en el cual obtuvo el óptimo resultado con NaOCl al 2.5% frente a la bacteria previamente mencionada.

La tercera concentración de NaOCl que se analizó fue al 1.25% en donde los resultados para ambas bacterias y la mezcla fue de una reducción bacteriana del 80%. Resultados que son similares a los publicados recientemente en donde el número medio de células bacterianas recuperadas del grupo NaOCl al 1% fue significativamente mayor que la del NaOCl al 4%. (Christo et al., 2015)

A ninguna de las concentraciones se logró una eliminación por completo de ambas bacterias, lo cual va de acuerdo con los reportes encontrados. Hasta ahora, no hay soluciones Irrigante capaces de eliminar completamente *E. faecalis* del conducto radicular. (Flach et al., 2015)

En esta investigación se concluyó que no solamente la concentración, sino que también el pH de los irrigantes, así como el medio de cultivo juegan un papel importante en la alteración del crecimiento de las bacterias. Como se puede observar en nuestros resultados, las bacterias tuvieron un comportamiento distinto frente a la misma molécula a la misma concentración si se encontraban en agar o en caldo. Ma et al., 2015 concluyen en su investigación que NaOCl al 5.25% en combinación con un desafío alcalino posterior disminuyó significativamente las tasas de supervivencia planctónicas de *E. Faecalis*.

A pesar de que los resultados de las investigaciones in vitro no pueden ser extrapolados a las situaciones in vivo son una aproximación que nos permite evaluar y comparar la eficacia de los materiales.

CONCLUSIONES

Bajo la metodología desarrollada en la presente investigación y en base con los objetivos planteados, así como los resultados obtenidos se puede concluir que:

- La fase logarítmica de crecimiento identificada mediante la cinética de crecimiento para *E. Faecalis* fue a las 10 horas, y para *P. endodontalis* fue a las 17 horas.
- Se logró observar el mayor efecto antimicrobiano del CatDex sobre *P. endodontalis* utilizando la técnica de sensibilidad en disco (método Kirby-Bauer) a la concentración de 0.17%. Sin embargo, *E. Faecalis* mostró una resistencia a la molécula mediante esta técnica no presentado efecto antimicrobiano.
- Con la prueba de concentración mínima inhibitoria se obtuvo que el mayor porcentaje de reducción bacteriana para *Porphyromonas endodontalis* con el NaOCl fue de 97.8% al 5.25%, mientras que para el CatDex al 1% fue de 90.8%. Para *Enterococcus faecalis* con el NaOCl fue de 96.9% al 5.25%, mientras que para el CatDex al 0.145% fue de 55%.
- En la mezcla bacteriana el CatDex al 1% logró la mayor reducción celular que fue del 90%, mientras que el NaOCl al 5.25% el 99%.

En base a los resultados obtenidos, se rechaza la **HIPOTESIS** que se planteó ya que el CatDex no logró igualar ni superar el efecto antimicrobiano del NaOCl.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de citotoxicidad para el CatDex a mayores concentraciones para descartar efectos adversos

1. Aumentar la concentración del CatDex, para ver si a mayores concentraciones logra tener un mayor efecto antimicrobiano.
2. Tomar en cuenta el pH de la molécula CatDex y utilizar un vehículo que tenga un pH más alcalino que iguale el del NaOCl.
3. Realizar investigaciones para evaluar la duración del efecto del CatDex y pensar en la utilización de éste como medicamento intraconducto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, et al. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30–6
2. Alves DR, Cunha RS, da Silveria Bueno CE, de Alencar AH, de Araujo Estrela CR, dos Santos TO, Estrela C. Antibacterial Potential of 2.5% Sodium Hypochlorite in Distinct Irrigation Protocols on *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Contemp Dent Pract*. 2015;16:340-6.
3. Bae K, Craig J, Shearer T, David L. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *J Endod* 1997;23:620-3
4. Berkiten M, Okar I, Berkiten R. In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. *J Endod* 2000; 26:236-9
5. Bramante CM, Carpio-Perochena AE, Duarte M, Cavalini B. Biofilm Dissolution and Cleaning Ability of Different Irrigant Solutions on Intraorally Infected Dentin. *J Endod* 2011;37: 1134-1138
6. Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Yuan-ling Ng. Contemporary Root Canal Irrigants Are Able to Disrupt and Eradicate Single- and Dual-Species Biofilms. *J Endod* 2009;35:1243–1248
7. Caliskan MK, Turkun M, Alper S. Allergy to sodium hypochlorite during root canal therapy: a case report. *Int Endod J* 1994;27:163–7
8. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002; 28:17–9
9. Chávez de Paz L. Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible

- Role of Biofilm Communities. J Endod 2007; 33:652– 662
10. Carson KR, Goodell G, McClanahan SB, Comparison of the Antimicrobial Activity of Six Irrigants on Primary Endodontic Pathogens. J Endod 2005; 31: 471-473
 11. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M. The Effect of Exposure to Irrigant Solutions on Apical Dentin Biofilms In Vitro. J Endod 2006;32:434– 437
 12. Chow TW. Mechanical Effectiveness of Root Canal Irrigation. JEndod 1983;9:475-479
 13. Christo JE, Zilm PS, Sullivan T, Cathro PR. Efficacy of low concentrations of sodium hypochlorite and low-powered Er, Cr: YSGG laser actividad irrigation against an *Enterococcus faecalis* biofilm. Int Endod J 2015 Mar 2013
 14. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002;15:167–93
 15. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative Evaluation of Endodontic Irrigants against *Enterococcus faecalis* Biofilms. Journal of Endodontics 2006;32 (6):527-31
 16. Escamilla E, Alcazar A, Segoviano JC, Lopez A, De la Garza M, Medina C, Márquez M, Holmberg A. Antimicrobial Activity of CatDex against two oral bacteria: *Porphyromonas gingivalis*-W83 and *Streptococcus mutans*-UA130.
 17. Flach N, Bottcher DE, Parolo CC, Firmino LB, Malt M, Lammers ML, Grecca FS. Confocal microscopy evaluation of the effect of irrigants on *Enterococcus Faecalis* biofilm: In vitro study. 2015 Jul 7: Epub ahead of print.
 18. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. J Endod 2007;33: 852-855

19. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis*. *Biofilm. Journal of Endodontics* 2007;33(7): 852-5.
20. Grossman LI. Irrigation of root canals. *J Am Dent Assoc* 1943;30:1915–7
21. Krause T, Liewehr F, Hahn C. The Antimicrobial Effect of MTAD, Sodium Hypochlorite, Doxycycline, and Citric Acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:28-30
22. Haikel Y, Gorce F, Allemann C, Voegel J C. In vitro efficiency of endodontic irrigation solutions on protein desorption. *Int Endod J* 1994;27:16 –20
23. Harrison JW. Irrigation of the root canal system. *Dent Clin North Am* 1984;28:797– 808.
24. Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation—literature review and case reports. *Int Endod J* 2000;33:186 –93
25. Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* 2003;36:810 –30.
26. Jenkins SM, Hayes SJ, Dummer PM. A study of endodontic treatment carried out in dental practice within the UK. *Int Endod J* 2001;34:16 –22
27. Kamburis JJ, Barker TH, Barfield RD, Eleazer PD. Removal of organic debris from bovine dentin shavings. *J Endod* 2003;29:559 – 61
28. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ., 1965. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Sep*; 20:340

29. Karkare SR, Ahire NP, Khedkar SU . Comparative evaluation of antimicrobial activity of hydroalcoholic extract of Aloe vera, garlic, and 5% sodium hypochlorite as root canal irrigants against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2015;33: 274-8
30. Kim RJ, Kim MO, Lee KS, Lee DY, Shin JH. An in vitro evaluation of the antibacterial properties of three mineral trioxide aggregate (MTA) against five oral bacteria. *Arch Oral Biol*. 2015;60:1497-502.
31. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod* 1998;24: 472-476
32. Lana M, Ribeiro-Sobrinho A, Stehling R, Garcia G, Hamdan J et al. Microorganisms isolated from root canals present in necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001, 16:100-5
33. Márquez M, Nilsson S, Lennartsson L, Hiltunen J, Westlin JE et al: Development of dextran derivatives with cytotoxic effects in human urinary bladder cancer cell lines. *Anticancer Res* 2002, 22(2A): 741-744
34. Márquez M, Nilsson S, Lennartsson L, Liu Z, Tammela T, Raitanen M, Holemberg AR. Charge-dependent targeting: results in six tumor cell lines. *Anticancer Res* 2004, 24(3A):1347-1352
35. Marquis VL, Dao T, Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S. Treatment Outcome in Endodontics: The Toronto Study. Phase III: initial Treatment. *J Endod* 2006;32:299 –306
36. Meurling L, Marquez M, Nilsson S, Holemberg AR. Polymer-conjugated guanidine is a potential useful anti-tumor target. *Int J Oncol* 2009, 35(2):281-285
37. Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol* 2000;1997(13):121–48

38. Odell LJ, Baumgartner JC, David L. Survey for collagenase gene *prtC* in *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis* isolated from endodontic infections. J Endod 1999; 25:555-558
39. Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D., 2003. "Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants". Int J. Endod Jun; 36(6):423-32.
40. Ordinola R, Bramante CM, Gomez I, Bernardineli N. Confocal Laser Scanning Microscopy Is Appropriate to Detect Viability of *Enterococcus faecalis* in Infected Dentin. J Endod 2008; 34: 1198-1201
41. Özok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. Comparison of Growth and Susceptibility to Sodium Hypochlorite of Mono- and Dual-Species Biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus (micromonas) micros*. J Endod 2007;33: 819 -822 Pages 819-822
42. Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K. Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Herbal Alternatives (Triphala and Green Tea Polyphenols), MTAD, and 5% Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilm Formed on Tooth Substrate: An In Vitro Study. J Endod 2010;36:83–86
43. Pupo Marrugo S, Díaz Caballero A, Castellanos Berrio P, Simancas Escorcia V. Elimination of *Enterococcus faecalis* using sodium hypochlorite, chlorhexidine and MTAD in root Canals. Av. Odontoestomatol 2014;30: 101-108
44. Ravi Chandra PV, Kumar VH, Reddy SJ, Kiran DR, Krishna MN, Kumar GV. Biofilm forming capacity of *Enterococcus faecalis* on Gutta-percha points treated with four disinfectants using confocal scanning laser microscope: An invitro study. Dent Res J (Isfahan). 2015 Jul-Aug;12(4):331-6
45. Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio R. Minimum Contact Time and Concentration of Sodium Hypochlorite Required to Eliminate *Enterococcus faecalis*. J Endod 2010;36:520-523

46. Rocas IN, Hulsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 2008;34:926–31
47. Rocas IN, Siqueira JF Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod* 2011; 37: 143-150.
48. Ricucci D, Siqueira JF, Bate AL, Ford T. Histologic Investigation of Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis: A Retrospective Study from Twenty-four Patients. *J Endod* 2009 Apr; 35, (4): 493-502
49. Ricucci D, Siqueira JF, Biofilms and Apical Periodontitis: Study of Prevalence and Association with Clinical and Histopathologic Findings. *J Endod* 2010; 36:1277-1288
50. Safavi KE, Spangberg LS, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod* 1990;16:207–10
51. Salles MM, Oliveira Vde C, Souza RF, Silva CH, Paranhos Hde F. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning- in vitro evaluation. *Braz Oral Res.* 2015;29(1):1-6
52. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am* 1974;18:269 -96
53. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006; 39:878-85.
54. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:297–306
55. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M, Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture. *J Endod* 2010; 36: 1820-1823

56. Siqueira JF, Rôça IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *Journal of Endodontics* Nov. Vol. 34, Issue 11, Pages 1291-1301
57. Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J* 2001;34:120 –32.
58. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*. – Contaminated Root Canals of Extracted Human Teeth. *Journal of Endodontics* 2003;29(9):576-9.
59. Sundqvist G. *Bacteriological studies of necrotic dental pulps*. Umeå: Umeå University, 1976.
60. Siqueira JF, Rôças I, Santos S, Lima KC, Magalha F, De Uzeda M. Efficacy of Instrumentation Techniques and Irrigation Regimens in Reducing the Bacterial Population within Root Canals. *J Endod* 2002;28: 181-4
61. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86–93
62. Tuncay Ö, Dinçer AN, Kuştarıcı A, Er Ö, Dinç G, Demirbuga S. Effects of ozone and photo-activated disinfection against *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *Niger J Clin Pract*. 2015 Nov-Dec;18(6):814-8.
63. Turk BT, Sen BH, Ozturk T. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2009;108(2):297-301.
64. Vera J, Siqueira JF, Ricucci D, Loghin S., 2012. One- versus Two-visit Endodontic Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Histobacteriologic Study. *J Endod*. 2012;38:1040-52

65. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2004;97(1):79-84.
66. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of Endodontic Disinfecting Solutions against Young and Old *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. *J Endod* 2012;38: 1376-1379
67. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of Smear Layer against Disinfection Protocols on *Enterococcus faecalis*-infected Dentin. *J Endod* 2013; 39:1395.
68. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial Susceptibility of Monoculture Biofilms of a Clinical Isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 2009;35(1):95-7.
69. Xie Q, Johnson BR, Wenckus CS, Fayad MI, Wu CD. Efficacy of berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic irrigant against a mixed-culture biofilm in an in vitro tooth model. *J Endod.* 2012; 38:1114-7
70. Yguel-Henry S, Vannesson H, von Stebut J. High precision, simulated cutting efficiency measurement of endodontic root canal instruments: influence of file configuration and lubrication. *J Endod* 1990;16:418 –22
71. Zehnder, M. Root Canal Irrigants. *J Endod* 2006;32: 389 –398
72. Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfection potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:608 – 13