

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



“EVALUACIÓN ANTIBIOFILM POR EL EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE
PATÓGENOS ENDODONTALES”

Por

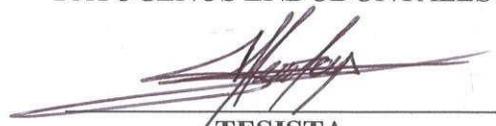
C.D. GABRIELA SOLÍS MONTOYA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Octubre, 2024

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
EN EL ÁREA DE ENDODONCIA.**

**“EVALUACIÓN ANTIBIOFILM POR EL EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE
PATÓGENOS ENDODONTALES”**

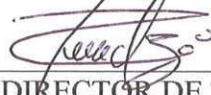


**TESISTA
GABRIELA SOLÍS MONTOYA**

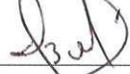
Comité de Tesis



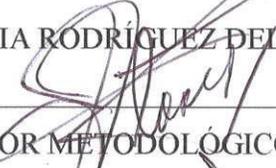
**DIRECTOR DE TESIS
DRA. FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ**



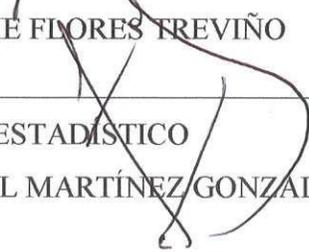
**CODIRECTOR DE TESIS
DR. RENÉ HERNÁNDEZ DELGADILLO**



**ASESOR METODOLÓGICO
DRA. IDALIA RODRÍGUEZ DELGADO**



**ASESOR METODOLÓGICO
DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO**



**ASESOR ESTADÍSTICO
DR. GUSTAVO ISRAEL MARTÍNEZ GONZALEZ**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
EN EL ÁREA DE ENDODONCIA.**

“EVALUACIÓN ANTIBIOFILM POR EL EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE
PATÓGENOS ENDODONTALES”

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

C.D.M.O.A. ROSA ISELA SÁNCHEZ NÁJERA PhD
SUBDIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE
ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

“EVALUACIÓN ANTIBIOFILM POR EL EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE
PATÓGENOS ENDODONTALES”

APROBACION 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 EN EL ÁREA
EN ENDODONCIA.

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO

**Dr.
PRESIDENTE**

**Dr.
SECRETARIO**

**Dr.
VOCAL**

AGRADECIMIENTOS

Finalmente concluyo una de las metas más importantes, por tanto, quiero tomarme un momento para expresar mi más profundo agradecimiento a cada uno de ustedes. Primeramente, quiero agradecerles desde el fondo de mi corazón a mis Padres Ignacio Solís y Rosa Ma. Montoya. Gracias por su amor incondicional, por haberme enseñado el valor de la perseverancia y el esfuerzo desde pequeña, por brindarme ánimo cuando más lo necesitaba, y para celebrar cada pequeño triunfo conmigo. Sin su apoyo inquebrantable, esta meta hubiera sido inalcanzable. A mis hermanas Daniela Solís y Marcela Solís gracias porque a lo largo de este proceso, han sido un pilar emocional fundamental para mí, sus palabras de aliento y su compañía han sido clave en esta travesía.

Al Dr. René Hernández Delgadillo, Codirector de mi tesis por brindarme su apoyo y conocimiento impartido a lo largo de este proyecto para poder concluir mi tesis, darme sus consejos y concederme de su tiempo para realizar cada uno de los experimentos realizados en el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Odontología. Así mismo a la Dra. Fanny López Martínez, Directora de mi tesis por animarme y brindarme su apoyo incondicional durante el transcurso de elaboración de éste, así como darme consejos no solo a nivel profesional como endodoncista, sino personales.

A cada uno de los Doctores del posgrado, mi más sincero agradecimiento por compartir su vasto conocimiento y experiencia conmigo. Su paciencia, exigencia y dedicación no solo me formaron como profesional, sino también me inspiraron a buscar siempre la excelencia en todo lo que hago. A mis compañeros del posgrado, gracias por compartir este viaje conmigo. Juntos enfrentamos desafíos, pasamos largas horas de estudio, la camaradería, el apoyo mutuo y las experiencias compartidas fueron una parte fundamental para hacer más divertido y ameno este proceso.

A mi querida amiga Tefy Nagay Reyes, que más que mi amiga es mi hermana, has estado ahí para apoyarme en los momentos más difíciles, y tu presencia ha sido una constante fuente de ánimo y motivación, además de desestresarnos juntas jugando parchís y cenando en las tardes. Gracias por ser mi confidente, mi apoyo emocional y mi compañera en este viaje.

A mis perrhijas Rouse y Rosita, que más que mis mascotas representan parte importante de mi familia que me reconfortaban cuando sentían mis bajas energías o me sacaban sus risas compartiendo con ellas el día.

Y por último, pero no menos importante a Dios por brindarme la paz, energía y motivación todos los días, pero más que nada por ponerme cada uno de los retos impartidos durante mi carrera para poder enfrentarme con ellos en el futuro, aunado a eso hacer una mención especial a aquellas personas que no están más conmigo en la vida terrenal pero que formaron y forman parte importante en mi vida mis Abuelos maternos y paternos.

Hoy celebro este logro con una mezcla de orgullo, gratitud y alegría, sabiendo que, aunque este camino estuvo lleno de retos, no lo recorrí sola. Cada uno de ustedes ha sido una pieza fundamental en este proceso, y por ello les estaré eternamente agradecida.

Con todo mi afecto y gratitud,
Gabriela Solís Montoya

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
RESUMEN.....	8
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. HIPÓTESIS	12
3.OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
4. ANTECEDENTES	14
4.1 Endodoncia.....	14
4.2 Irrigación.....	14
4.2.1 Características Ideales en Irrigantes.....	15
4.3 Soluciones Irrigantes.....	15
4.3.1 NaOCl (Hipoclorito de Sodio)	15
4.3.2 Clorhexidina (CHX).....	16
4.3.3 Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	17
4.4 Complejidad anatómica radicular: implicaciones en la desinfección	17
4.4.1 Sistema complejo anatómico radicular	18
4.4.2 Pulpa Cameral	18
4.4.3 Conductos radiculares	20
4.5 Identificación de los sistemas complejos radiculares	20
4.6 Anomalías dentales	21
4.6.1 Dens Evaginatus	22
4.6.2 Dens invaginatus o dens in dente	22
4.6.3 Conductos c-shape	22
4.6.4 Taurodontismo	23
4.7 Biofilm	23
4.7.1 Factor de Virulencia y Patogenicidad	24
4.7.2 Clasificación del biofilm	24
4.7.3 Diversidad microbiana en el biofilm endodóntico	25
4.8 Opciones terapéuticas alternativas para la desinfección de conductos radiculares	25

4.8.1 Ozono	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Infusión Brain-Heart	29
5.2 Cepas microbianas y condiciones de cultivo	29
5.3 Inducción del ozono en cepas microbianas aisladas	29
5.4 Análisis bactericida de ozonoterapia sobre el crecimiento de las cepas microbianas aisladas por medio del ensayo de viabilidad celular MTT	30
5.5 Selección-preparación de dientes unirradiculares extraídos e inoculación de cultivo mixto	31
5.6 Inducción de alternativas desinfectantes en el conducto radicular unirradicular.....	31
5.7 Actividad bactericida del ozono sobre el crecimiento del cultivo mixto por el ensayo de viabilidad celular "Live/Dead".....	32
5.8 Análisis estadístico	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Efecto de la Ozonoterapia sobre <i>E.faecalis</i> y <i>P. gingivalis</i>	34
6.2 Efecto de la ozonoterapia sobre el cultivo mixto	37
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIONES	42
9. LITERATURA CITADA	43

TESISTA: GABRIELA SOLÍS MONTOYA
DIRECTOR DE TESIS: DRA. FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ
CODIRECTOR DE TESIS: DR. RENÉ HERNÁNDEZ DELGADILLO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

RESUMEN

Evaluación del Efecto Antibiofilm de la Ozonoterapia sobre Patógenos Endodontales

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antibiofilm de la ozonoterapia (O_3) sobre patógenos endodontales, conocida por sus propiedades antimicrobianas y baja toxicidad, es una alternativa eficaz a los irrigantes convencionales en la endodoncia. Se realizó un análisis comparativo utilizando *E. faecalis* y *P. gingivalis* para determinar la efectividad de la ozonoterapia en la reducción del biofilm. **Introducción:** La endodoncia tiene como objetivo la desinfección del sistema de conductos radiculares. La instrumentación, por sí sola no es suficiente para erradicar las bacterias, por tanto, la ozonoterapia ofrece una opción más segura y eficaz en comparación con el hipoclorito de sodio (NaOCl), que presenta sus riesgos. **Materiales y Métodos:** Se seleccionaron dientes humanos extraídos por razones ortodónticas o periodontales y se almacenaron en una solución de formol al 10% hasta su uso. Los dientes se limpiaron y seccionaron para exponer los conductos radiculares, que fueron luego esterilizados en autoclave. Posteriormente, se contaminó cada diente con un cultivo mixto durante un periodo de 7 días para asegurar la formación de biofilm. Los dientes se dividieron aleatoriamente en tres grupos: un grupo control (sin tratamiento), un grupo tratado con NaOCl al 2.5%, y un grupo tratado con O_3 . El O_3 se aplicó utilizando una sonda específica que entregaba O_3 dentro del conducto radicular durante 30 segundos. Para evaluar la reducción del biofilm, se realizaron muestreos microbiológicos antes y después del tratamiento. Los especímenes fueron cultivados en medios selectivos y las colonias contadas para determinar la unidad formadora de colonias (UFC). Además, se realizaron análisis estadísticos para comparar la eficacia de cada tratamiento y un posterior ensayo Live and Dead. **Resultados:** Los resultados mostraron una reducción del biofilm en los conductos tratados con ozono en comparación con el grupo control. El grupo tratado con NaOCl mostró una reducción significativa, sin embargo, la ozonoterapia mostró resultados similares al NaOCl en términos de reducción de UFC. **Discusión:** Los hallazgos de este estudio coinciden con estudios previos que destacan el potencial de la ozonoterapia en la desinfección endodóntica. Por ejemplo, un estudio realizado por Estrela et al. (2017) demostró que el O_3 es eficaz contra una amplia gama de microorganismos patógenos sin causar daño a los tejidos circundantes. Además, Gonçalves et al. (2020) encontraron que la O_3 puede ser una alternativa segura y efectiva al hipoclorito de sodio, especialmente en casos donde la citotoxicidad es una preocupación. Un aspecto relevante de nuestro estudio es la comparación directa entre la O_3 y el NaOCl. Aunque ambos métodos mostraron eficacia en la reducción del biofilm, el O_3 presenta menor toxicidad y una aplicación más segura. Da Silva et al. (2021) corroboran estos resultados, indicando que la O_3 puede ser especialmente beneficiosa en tratamientos donde se requiere una desinfección profunda sin comprometer la salud de los tejidos circundantes. **Conclusión:** La O_3 es una alternativa viable y efectiva para la desinfección de conductos radiculares, presentando ventajas significativas sobre los métodos tradicionales en términos de seguridad y eficacia. Los estudios futuros deberían centrarse en optimizar las condiciones de aplicación del ozono y evaluar su efectividad en combinación con otras terapias endodónticas.

TESISTA: GABRIELA SOLÍS MONTOYA
DIRECTOR DE TESIS: DRA. FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ
CODIRECTOR DE TESIS: DR. RENÉ HERNÁNDEZ DELGADILLO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

SUMMARY

Evaluation of the Antibiofilm Effect of Ozone Therapy on Endodontic Pathogens

The objective of this study was to evaluate the antibiofilm effect of ozone therapy (O₃) on endodontic pathogens. Known for its antimicrobial properties and low toxicity, it is an effective alternative to conventional irrigants in endodontics. A comparative analysis was performed using *E. faecalis* and *P. gingivalis* to determine the effectiveness of ozone therapy in reducing biofilm. Introduction: The goal of endodontics is the disinfection of the root canal system. Instrumentation alone is not sufficient to eradicate bacteria; therefore, ozone therapy offers a safer and more effective option compared to sodium hypochlorite (NaOCl), which carries certain risks. Materials and Methods: Extracted human teeth, selected for orthodontic or periodontal reasons, were stored in a 10% formalin solution until use. The teeth were cleaned and sectioned to expose the root canals, which were then sterilized in an autoclave. Subsequently, each tooth was contaminated with a mixed culture over a period of 7 days to ensure biofilm formation. The teeth were randomly divided into three groups: a control group (no treatment), a group treated with 2.5% NaOCl, and a group treated with O₃. O₃ was applied using a specific probe that delivered O₃ gas into the root canal for 30 seconds. To evaluate biofilm reduction, microbiological samples were taken before and after treatment. The specimens were cultured in selective media, and the colonies were counted to determine the colony-forming units (CFU). Additionally, statistical analyses were performed to compare the efficacy of each treatment and a subsequent Live and Dead assay. Results: The results showed a reduction in biofilm in the ozone-treated canals compared to the control group. The NaOCl-treated group showed a significant reduction; however, ozone therapy showed results like NaOCl in terms of CFU reduction. Discussion: The findings of this study are consistent with previous studies highlighting the potential of ozone therapy in endodontic disinfection. For instance, a study by Estrela et al. (2017) demonstrated that O₃ is effective against a wide range of pathogenic microorganisms without causing damage to surrounding tissues. Furthermore, Gonçalves et al. (2020) found that O₃ could be a safe and effective alternative to sodium hypochlorite, especially in cases where cytotoxicity is a concern. A relevant aspect of our study is the direct comparison between O₃ and NaOCl. Although both methods were effective in reducing biofilm, O₃ presents lower toxicity and a safer application. Da Silva et al. (2021) supports these results, indicating that O₃ could be particularly beneficial in treatments requiring deep disinfection without compromising the health of surrounding tissues. Conclusion: O₃ is a viable and effective alternative for root canal disinfection, offering significant advantages over traditional methods in terms of safety and efficacy. Future studies should focus on optimizing ozone application conditions and evaluating its effectiveness in combination with other endodontic therapies.

1.- **Introducción**

El tratamiento de conductos tiene como fin hacer la remoción del tejido pulpar afectado (necrosis pulpar o inflamación), creando así, una conformación óptima de los conductos radiculares y alistarlos para dar paso a los irrigantes antisépticos, ya que la instrumentación mecánica por sí sola no podría reducir el porcentaje bacteriano, quienes tienen la habilidad de formar biofilms sobre superficies sólidas en presencia de fluidos que contienen nutrientes (Oxígeno, Nutrientes y Óxido Nítrico) y de los cuales forman parte del fracaso endodóntico.

La irrigación se considera el medio principal de limpieza y desinfección del sistema de conductos radiculares. Por mucho tiempo la debridación y desinfección de los conductos radiculares, se retribuí primeramente a la instrumentación, dando así menos importancia a los irrigantes. Sin embargo, la instrumentación por sí sola no es capaz de alcanzar a limpiar todas las áreas anatómicas del sistema de conductos y, la irrigación como su complemento dentro del proceso, facilita no solo el deslizamiento sin fricción de los instrumentos, sino a desinfectar y llegar a todas las complejidades anatómicas presentes (conductos accesorios, ramificaciones, conexiones entre conductos, itsmos, deltas apicales, etc.), que pueden influir en el éxito del tratamiento endodóntico.

Dentro de una correcta irrigación, un factor fundamental es el volumen con el que se irriga, mientras más volumen, más grande la desinfección será, la cual debe así mismo, obtener efectos químicos, mecánicos y biológicos cumpliendo con las propiedades ideales de un irrigante para su uso clínico. No obstante, aun teniendo las cualidades ideales de un irrigante, no todos cumplen con todos los criterios, como el Hipoclorito de sodio (NaOCl), quien tiene un historial largo en su uso en el área de salud. Es una de las soluciones irrigantes más usadas dentro del tratamiento endodóntico, principalmente por su capacidad de disolver tejidos y acción antibiofilm. A pesar

de eso, es altamente citotóxico y provoca daño a los tejidos periapicales si se es extruido. Un percance que puede poner en riesgo la vida o causar grandes secuelas a largo plazo o de forma permanente con negligencia e implicaciones legales. Se afirma que muchos profesionales lo habrían experimentado al menos una vez en su carrera.

La aplicación del ozono en el campo de la medicina ha sido indicada para la prevención y tratamiento de diversas patologías en odontología. En la actualidad, dado que la mayoría de los pacientes se están volviendo más resistentes a los antibióticos, el ozono emergió como un nuevo complemento terapéutico en el cuidado bucal, ya que la ozonoterapia es atraumática, indolora y no invasiva, lo que aumenta la aceptabilidad del paciente.

Por tanto, el ozono (O_3) es presentado como una posible irrigante como agente antiséptico alternativo por su poder antimicrobiano y su baja toxicidad. Sin embargo, no hay suficiente información sobre el tiempo y concentración para su uso como irrigante dentro del tratamiento de conductos contra el biofilm presente en los conductos radiculares. El O_3 es un compuesto natural que consiste en 3 átomos de oxígeno. Debido a sus buenas propiedades microbiológicas (bactericidas, virucidas, hongos, etc.), lo cual lo convierte en un buen desinfectante de amplio espectro, ya que una sola molécula de ozono equivale a entre 3,000 y 10,000 moléculas de cloro, por lo que actúa unas 3,500 veces más rápido sobre los microorganismos.

2.- Hipótesis

El tratamiento con ozonoterapia presenta actividad antibiofilm sobre patógenos endodontales en un modelo de dentina.

3.- Objetivos

3.1.- Objetivo General

Evaluar el efecto antibiofilm con ozonoterapia sobre patógenos endodontales en modelo de dentina.

3.2.- Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto de ozonoterapia sobre el crecimiento de *E. faecalis* y *P. gingivalis* a diferentes tiempos de exposición.
- Evaluar el efecto de ozonoterapia sobre un cultivo mixto.
- Analizar el efecto antibiofilm de la ozonoterapia sobre superficie de dentina en un cultivo mixto (*E. faecalis*, *gordoni*, *Pg*, *Candida albicans*).

4. Antecedentes

4.1 Endodoncia

El objetivo principal de la terapia endodóntica sigue siendo expandir y dar forma mecánicamente al sistema de conductos radiculares endodónticos para favorecer la desinfección. (Mustafa M, et al., 2022). Las Bacterias desempeñan un papel clave en el desarrollo de la enfermedad pulpar y periapical. (KAKEHASHI S, 1965). El éxito del que depende el tratamiento en gran medida es la eliminación de la contaminación microbiana del sistema de conductos radiculares. Aunque se



pueden usar instrumentos mecánicos del conducto radicular para reducir la cantidad de bacterias, no se puede lograr una eliminación bacteriana eficaz sin irrigación del conducto radicular y agentes antimicrobianos. (El Karim et al., 2007). Tanto en la enseñanza a los estudiantes de pregrado de odontología como

Figura 1 Factores que afectan en el éxito del tratamiento de conductos.

en la clínica práctica de endodoncia,

a menudo se pasa por alto la importancia del uso de irrigantes en el tratamiento de endodoncia no quirúrgico. (Regan JD y Fleury AA, 2006). La desinfección es una parte importante de la preparación del conducto radicular antes de la obturación. Los métodos de limpieza química incluyen irrigación y medicamentos intraconducto. (Martin H, 1991)

4.2 Irrigación

La irrigación es un complemento a la instrumentación en la desinfección y limpieza de los conductos radiculares. (Chow TW, 1983); Es así, la disolución o alteración química y desprendimiento mecánico del tejido pulpar, restos de dentina y capas de barrillo dentinario

(producto de la instrumentación), microorganismos (planctónicos o biofilm) y sus productos de la pared del conducto radicular, su eliminación del conducto radicular sistema. (Van der Sluis et al.,2015); Facilita igualmente la instrumentación debido a las irregularidades anatómicas en el sistema de conductos radiculares (Teplitsky PE, et al.,1987) y dentro de estas regiones inaccesibles se pueden desarrollar biopelículas complejas que no se rompen fácilmente. (Darcey J, et al.,2016)

4.2.1 Características Ideales en Irrigantes.

- Amplio espectro antimicrobiano y gran eficacia contra microorganismos anaerobios y facultativos organizados en biopelículas
- Disolver restos de tejido pulpar necrótico
- Inactivar la endotoxina
- Evitar la formación de un barrillo dentinario durante la instrumentación o disolver este último una vez formado.
- No tóxico (Ni sistémicamente, ni para los tejidos periodontales)
- Sin potencial anafiláctico (Zehnder M, 2006).

4.3 Soluciones Irrigantes

4.3.1 NaOCl (Hipoclorito de Sodio)

Reconocido en 1843 y usado como agente antibacteriano, se introdujo su uso como solución para higiene de manos, habiendo transmisión baja de infecciones. Y como uso endodóntico por primera vez como irrigante fue en 1920 (Spencer HR, et al., 2007); Con buena capacidad de disolución de tejido, el NaOCl fue y es el irrigante favorito en endodoncia. (Khademi A et al., 2007). Inhibe irreversiblemente las enzimas microbianas y destruye sus membranas celulares, el

NaOCl por tanto, tiene una actividad bactericida, esporicida y virucida de amplio espectro. (Kanagasingam S y Blum IR, 2020). Se encontró que algunas especies bacterianas que también contribuyen a la infección del conducto radicular son más sensibles al NaOCl que *E. faecalis*. (Cai C et al.,2023).

Sin embargo, aunque el uso de NaOCl 5% es aceptable clínicamente y es un procedimiento altamente efectivo, debe usarse con prudencia y precaución para que no pase del periápice donde puede provocar reacciones inflamatorias graves. (Pashley EL et al.,1985). Se informó que la frecuencia de extrusión de NaOCl y accidente de NaOCl fue del 0,89 % y el 0,18 %, respectivamente y se afirma que muchos profesionales lo habrían experimentado al menos una vez en su carrera. (Vivekananda Pai AR, 2023)

4.3.2 Clorhexidina (CHX)

Desarrollada a fines de la década de 1940, en los laboratorios de investigación de Imperial Chemical Industries Ltd. (Macclesfield, Inglaterra). (Zehnder M, 2006) y es un bis-guanida catiónico sintético que consta de dos anillos simétricos de 4-clorofenilo y dos grupos biguanida, conectados por una cadena central de hexametileno. (Mohammadi Z y Abbott PV, 2009). CHX carece de la capacidad de disolver tejidos y puede ser menos irritante para los tejidos vitales. Se puede utilizar en forma de solución o gel y en concentraciones que van del 0,2% al 2%. La forma de gel da diferentes propiedades de la solución debido a su viscosidad y capacidad para eliminar gran parte del detritus. (Silveira CMM, et al.,2019) Así como la propiedad de sustantividad a la dentina debido a su molécula catiónica, son algunos de los beneficios del uso de CHX. (Zandi H et al.,2019)

A diferencia del NaOCl, las altas concentraciones de CHX ejercen un efecto bactericida, mientras que las bajas concentraciones solo proporcionan un efecto bacteriostático. (Ruksakiet K, 2020). CHX tiene excelentes propiedades antisépticas, y ya ha sido probada su eficacia en el control químico del biofilm dental en pacientes con enfermedad periodontal (Gonçalves LS, et al.,2016)

4.3.3 Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)

El EDTA es un ácido poliprótico cuyas sales de sodio son agentes orgánicos no coloidales que pueden formar quelatos no iónicos con iones metálicos. (Rossi-Fedele G, et al., 2012).

Es un quelante, que se utiliza después de NaOCl como irrigante final. Generalmente se usa como una solución al 17% o al 15%, aunque algunos estudios han sugerido que la solución de EDTA al 5% e incluso al 1% es lo suficientemente fuerte para eliminar la capa de barrillo dentinario. (Haapasalo M, et al.,2014).

EDTA de alta concentración reduce la resistencia de la dentina y la eficacia de disolución de las sustancias orgánicas en la solución de NaOCl. (Huang CS, et al., 2023)

La irrigación con EDTA durante 1 minuto es eficaz para eliminar el barrillo dentinario. Sin embargo, una aplicación de EDTA durante 10 minutos causa una erosión dentinaria peritubular e intertubular excesiva. (Calt S y Serper A, 2002)

Muchos investigadores han informado que la solución de EDTA al 15% fue el agente más útil para eliminar el barrillo dentinario. (Yoshida T, et al.,1995)

Si bien los agentes quelantes en forma de pasta están disponibles, existe evidencia de que estas pastas son menos efectivas que la solución de EDTA en la eliminación de la capa de barrillo dentinario. (Young GR, et al.,2007)

Ya se ha informado que la citotoxicidad del ácido cítrico y del EDTA es proporcional a su concentración. Sabiendo que el ácido cítrico diluido al 10 % y el EDTA al 17 % matan las células en un corto período de tiempo. (Sceiza MF, et al.,2001)

4.4 Complejidad anatómica radicular: implicaciones en la desinfección.

El tratamiento en anatomías complejas y anormales requiere el conocimiento sobre la anatomía interna dental de todos los tipos antes de realizarla. Así como, los efectos desinfectantes de los instrumentos y los irrigantes pueden verse obstaculizados en presencia de conductos accesorios,

ramificaciones, conexiones entre conductos, aletas, istmos y deltas apicales, sitios ideales para la formación de biopelículas microbianas y no pueden limpiarse adecuadamente. (Versiani, M. A. y Ordinola-Zapata, 2015)

La complejidad anatómica del diente influye en el éxito del tratamiento de endodoncia, ya que el acceso y desinfección del sistema de conductos radiculares puede ser difícil (Candeiro GTM et al.,2023)

La topografía computarizada de haz cónico (CBCT) se ha convertido en una herramienta valiosa para la práctica de la endodoncia. Se ha utilizado ampliamente en diversas aplicaciones de la terapia de endodoncia, incluido el diagnóstico y el tratamiento, así como para examinar la morfología del conducto radicular. (Azim AA, et al.,2014)

4.4.1 Sistema complejo anatómico radicular

La pulpa dental es un tejido celular vivo gelatinoso blando de origen ectomesenquimatoso que tiene varias funciones y reside dentro de estructuras mineralizadas duras de dos capas como el esmalte, la dentina y el cemento. (Sarkar S y Rao AP, 2002)

4.4.2 Pulpa Cameral

El sistema de conductos radiculares se puede dividir en dos partes: la cámara pulpar, ubicada dentro de la corona dental anatómica, y el conducto radicular, que se encuentra dentro de la porción radicular del diente. (Versiani et al.,2015).

Es una sola cavidad, con dimensiones variadas según la morfología coronaria y la estructura básica de las raíces. En dientes multirradiculares, la profundidad de ésta, por lo general depende de la posición de la bifurcación, y se puede extender más allá de la estructura de la corona anatómica. (Fernandes M, et al., 2014)

Barrett ha afirmado que el estudio de la morfología de la cavidad pulpar es el más complejo entre todas las fases de los sistemas anatómicos. (Pawar AM y Singh S, 2020)

La causa de la mayoría de los fracasos endodónticos es la instrumentación biomecánica inadecuada del sistema de conductos radiculares, resultado del desconocimiento de la anatomía del conducto radicular. Si uno o más de los conductos radiculares no se descubren, aumenta el potencial de fracaso. Demostraron que existe una anatomía específica del piso y la pared de la cámara pulpar y escribieron leyes para ayudar a los médicos a identificarlas. (Krasner P y Rankow HJ, 2004). Estas leyes son:

Ley de centralidad: el suelo de la cámara pulpar siempre se encuentra en el centro del diente a la altura de la UCA.

- Ley de concetricidad: las paredes de la cámara pulpar son siempre concéntricas a la superficie externa del diente al nivel de la UCA.
- Ley de la CEJ: la CEJ es el punto de referencia más consistente y repetible para ubicar la posición de la cámara pulpar.
- Ley de simetría 1: a excepción de los molares maxilares, los orificios de los canales son equidistantes de una línea trazada en dirección mesial distal a través del piso de la cámara pulpar
- Ley de simetría 2: a excepción de los molares superiores, los orificios de los conductos se encuentran en una línea perpendicular a una línea trazada en dirección mesial-distal a través del centro del piso de la cámara pulpar.
- Ley del cambio de color: el color del piso de la cámara de pulpa siempre es más oscuro que el de las paredes
- Ley de ubicación de orificios 1: los orificios de los conductos radiculares siempre se ubican en la unión de las paredes y el piso
- Ley de ubicación de los orificios 2: los orificios de los conductos radiculares se encuentran en los ángulos de la unión suelo-pared

- Ley de la ubicación del orificio 3: los orificios de los conductos radiculares están ubicados en el extremo de las líneas de fusión del desarrollo de la raíz

4.4.3 Conductos radiculares

Preiswerk (1901) el primero que determinó que los conductos radiculares de los dientes humanos son mucho más complejos en estructura, determinó que existe una gran variabilidad en forma, número y ramificación en los conductos radiculares. (Hess, W et al.,1921).

Cuando al formarse el esmalte y dentina alcanza la futura unión amelocementaria, la raíz dental comienza a desarrollarse a partir de la vaina radicular epitelial de Hertwig horizontal y puede variar en forma, dependiendo de si los dientes tienen una o varias raíces. De hecho, su forma determina el número de raíces en un diente. (Kottoor J, et al.,2013)

Los investigadores han mostrado múltiples forámenes, conductos adicionales, aletas, deltas, conexiones entre conductos, bucles, conductos en "forma de C" y conductos accesorios. (Vertucci, F. J. ,2005)

4.5 Identificación de los sistemas complejos radiculares

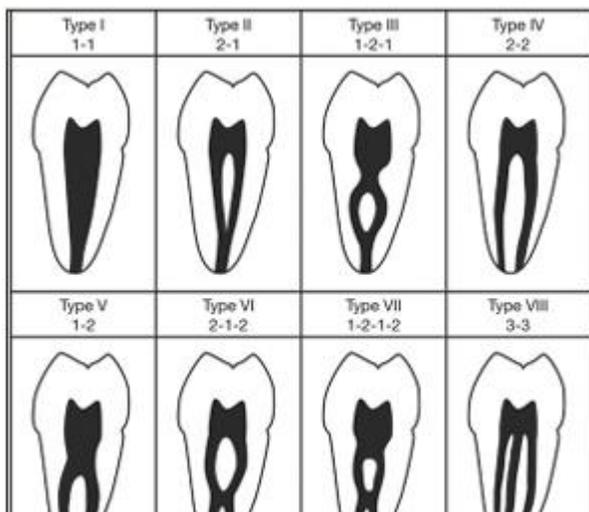


Figura 2- Clasificación de los sistemas complejos de los conductos radiculares según Vertucci

Se analizaron 200 segundos premolares maxilares por Vertuchi et al., que tenían sus cavidades pulpares teñidas con tinte y encontró muchos sistemas complejos diferentes, identificando ocho configuraciones diferentes: (Vertucci F, et al.,1974)

- Tipo I: un solo canal desde la cámara pulpar hasta el ápice

- Tipo II: dos conductos separados que salen de la cámara, pero se unen antes del vértice para formar un solo conducto
- Tipo III: un solo canal que se divide en dos y luego se fusiona para salir como uno solo
- Tipo IV: dos canales distintos desde la cámara pulpar hasta el ápice
- Tipo V: un solo canal que sale de la cámara y se divide en dos canales separados en el ápice
- Tipo VI: dos conductos separados que salen de la cámara pulpar se fusionan en el cuerpo de la raíz y se dividen nuevamente en dos conductos distintos cortos desde el ápice.
- Tipo VII: un canal único que se divide se fusiona y sale en dos canales distintos antes del vértice
- Tipo VIII: tres canales distintos desde la cámara pulpar hasta el ápice

Se ha defendido que cualquier desaparición repentina o estrechamiento del conducto radicular en el examen radiográfico preliminar se tome en cuenta como hallazgos que pueden implicar la divergencia del conducto radicular principal y la existencia de ramificaciones. (Holtzman L,1998)

4.6 Anomalías dentales

Se ha informado que factores genéticos específicos son responsables del desarrollo de anomalías dentales en cada mandíbula. Además, las alteraciones creadas durante el desarrollo de los dientes pueden producir variaciones en el número de dientes (agenesia/dientes supernumerarios), su tamaño y forma, y la posición del germen dentario, lo que puede afectar tanto a la dentición permanente como a la temporal de ambos maxilares. (Sella Tunis T, et al.,2021)

Creemos que las variaciones entre la prevalencia de otra población son causadas por variaciones raciales y ambientales, así como por los criterios diagnósticos. (Roslan AA, et al.,2018)

4.6.1 Dens Evaginatus

Relativamente raro; varios investigadores han informado que afecta principalmente a los premolares, pero que también puede ocurrir en molares, caninos e incisivos. Caracterizado como un tubérculo de esmalte similar a un pezón que se extiende desde la superficie afectada del diente afectado. El tratamiento implica la extracción o la terapia de endodoncia para el diente afectado. (Priddy WL, et al.,1976)

4.6.2 Dens invaginatus o dens in dente

Resultado de una invaginación del órgano del esmalte en la papila dental durante la odontogénesis. Radiográficamente, se ve como una invaginación radiotransparente rodeada por un área radiopaca (esmalte) limitada a la corona del diente o que se extiende hacia la raíz. El manejo de estos dientes incluye el sellado preventivo o el relleno de la invaginación, o si la pulpa está afectada, las opciones terapéuticas incluyen terapia de pulpa vital, tratamiento de conducto radicular no quirúrgico, apexificación o procedimientos de endodoncia regenerativa, cirugía perirradicular, reimplantación intencional o extracción. (Siqueira JF Jr, et al.,2022)

4.6.3 Conductos C-Shape

La configuración del conducto en forma de C fue reportada por primera vez por Cooke y Cox en 1979. Ellos relataron que esta variante de la morfología del canal radicular en los segundos molares mandibulares puede acercarse al 8%. (Bolger WL y Schindler WG,1988).

La principal característica anatómica es la presencia de una aleta o red que conecta los conductos radiculares individuales; el orificio puede aparecer como una única abertura en forma de cinta con un arco de 180° que une los dos conductos principales. Por lo general, se encuentra en dientes

con fusión de raíces ya sea en su cara bucal o lingual. El suelo de la cámara pulpar suele estar situado profundamente y puede asumir un aspecto anatómico inusual. (Fan B, et al.,2004)

4.6.4 Taurodontismo

Se define como un cambio en la forma del diente causado por la falla del diafragma de la vaina epitelial de Hertwig para invaginarse en el nivel horizontal adecuado. Los rasgos característicos son cámara pulpar agrandada, desplazamiento apical del suelo pulpar y ausencia de constricción a nivel de la unión amelocementaria. (Bharti R, et al.,2009)

Al realizar el tratamiento de conductos radiculares en estos dientes, se debe apreciar la complejidad del sistema de conductos radiculares. Exploración cuidadosa de los surcos entre todos los orificios, particularmente con aumento; irrigación ultrasónica; y se recomienda una técnica de obturación modificada. (Jafarzadeh H, et al.,2008)

4.7 Biofilm

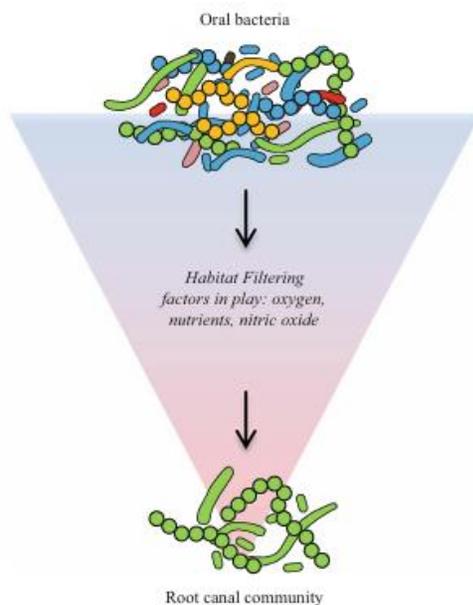


figura 3 Selección de colonizadores del conducto radicular mediante filtrado de hábitat.

Las biopelículas son comunidades microbianas sésiles compuestas de células unidas irreversiblemente a un sustrato e interfaz o entre sí. Ultraestructuralmente forman microcolonias en forma de torre o hongo con canales intercalados que están separados del ambiente externo y a través de los cuales los fluidos se mueven por convección. (Duggan JM y Sedgley CM, 2007)

Una de las razones de los fracasos en el tratamiento endodóntico es la presencia de biofilm en los conductos radiculares. Las bacterias del biofilm

tienen un metabolismo más lento y una mayor resistencia y virulencia debido a los cambios fenotípicos. Se ha informado la aparición de biopelículas tanto dentro del canal como en la superficie externa de la raíz. (Debicka P, et al.,2008)

Las comunidades microbianas se conocen comúnmente como biopelículas. Las biopelículas evocan los estilos de vida de microbios agregados, sésiles o adheridos en cualquier entorno y contrastan con sus contrapartes planctónicas que flotan libremente. Uno de los pasos críticos en el desarrollo de biopelículas es la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) contribuyendo así la arquitectura de la comunidad de biopelículas. (Kreth, J. y & Herzberg, M. C, 2015)

4.7.1 Factor de Virulencia y Patogenicidad

Las definiciones aceptadas de patógeno microbiano y microbiano se han formulado en gran medida a partir del estudio de infecciones causadas por un solo agente causal, aunque dos, representan combinaciones de parámetros muy complejas.

Por lo tanto, las clasificaciones de patógenos microbianos asignan a los microorganismos la responsabilidad principal de causar una determinada enfermedad en cada momento.

La virulencia de un patógeno se define como el grado de patogenicidad del organismo para causar enfermedad por un procedimiento experimental. (Chavez de Paz LE, 2007)

4.7.2 Clasificación del biofilm

Las biopelículas bacterianas endodónticas se clasifican en: (Jhajharia K, et al., 2015)

- Biopelículas intraconductos
- Biopelículas extrarradiculares
- Biopelículas periapicales

- Infecciones centradas en biomateriales.

4.7.3 Diversidad microbiana en el biofilm endodóntico

La comunidad bacteriana en la cavidad oral comprende más de 700 especies o taxones, sin embargo, un número limitado de especies encuentra las condiciones adecuadas para colonizar el sistema de conductos radiculares. (Ribeiro AC, et al., 2011)

El microbiota endodóntico descifrada por numerosos estudios culturales y moleculares. Se han identificado diferentes formas de periodontitis apical y más de 400 especies microbianas diferentes en muestras endodónticas de dientes. Las especies representativas más comunes pertenecen a los filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes y Synergistes. otros microorganismos se pueden encontrar en las infecciones endodónticas. Las arqueas y los hongos solo se han encontrado ocasionalmente en infecciones intrarradiculares, asociados frecuentemente con retratamientos. (Jhajharia K, et al., 2015)

4.8 Opciones terapéuticas alternativas para la desinfección de conductos radiculares

4.8.1 Ozono

El ozono (O_3) es una forma gaseosa inestable y energizada de oxígeno, que se disocia fácilmente de nuevo en oxígeno (O_2), liberando una forma reactiva de oxígeno, llamada oxígeno singlete (O_1). (Kishen, A., 2015).

La aplicación del ozono en el campo de la medicina ha sido indicada para la prevención y tratamiento de diversas patologías en odontología. En la actualidad, dado que la mayoría de los pacientes se están volviendo más resistentes a los antibióticos, el ozono está emergiendo como un nuevo complemento terapéutico en el cuidado bucal. La ozonoterapia es atraumática, indolora y no invasiva lo que aumenta la aceptabilidad del paciente. (Sen S y Sen S. 2020)

Table 1 – Major industrial uses of ozone		
Food industry	Chemical industry	Other industry uses
Food preservation	Oxidizing agent in the organic chemical industry	Disinfectant agent in drinking water and air
Shelf-life extension	Bleaching flour, paper pulp, starch, and sugar	Treating industrial wastes
Equipment sterilization	Processing certain perfumes, vanillin, and camphor	Deodorizing of feathers, air and sewage gases
Improvement of food plant effluent	Rapid drying of varnishes and printing inks	Bactericide
Disinfectant agent of food in cold storage rooms	Producing peroxides	Producing steroid hormones
Food preservative for cold storage of meats	Removal of chlorine from nitric acid	
Prevent the growth of yeast and mould in fruit storage	Oxidation of phenols and cyanides	
	Aging liquor and wood	

Source: Adopted from references [7] and [8].

Tabla 1. Azarpazhooh A, Limeback H. (2008) "Principales Industriales usos del O₃"

La ozonoterapia se basa en la suposición de que el ozono se disocia rápidamente en el agua y libera una forma reactiva de oxígeno que puede oxidar las células, mostrando eficacia antimicrobiana sin inducir resistencia a los irrigantes. (Nunes IA, et al.,2022)

Regulador de oxígeno

Flujo de oxígeno: 1/32, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 3/4, 1, 2, 3, 4 L/min

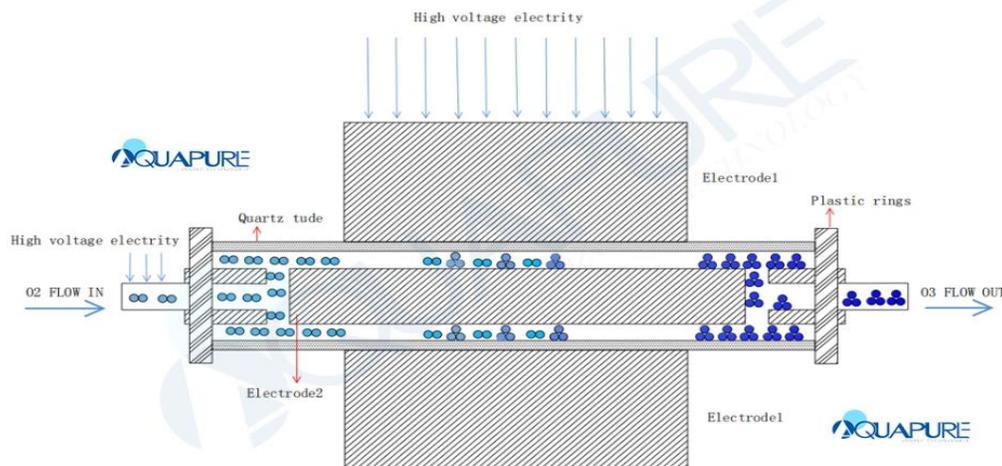


Figura 5. Esquema de producción de gas puro de oxígeno/ozono de altas concentraciones de O₃

Las propiedades bactericidas y virucidas del ozono son bien conocidas y se ha demostrado que reducen el nivel de *E. faecalis* viable en los túbulos dentinarios. (Case PD, et al.,2012).

El gas ozono con una concentración de 4 g m³ se usa actualmente en endodoncia para la desinfección del conducto radicular. A esa concentración es ligeramente menos citotóxico que el NaOCl (2,5 %) para el tejido periapical y la mucosa oral, así como es no tóxico para las células orales.

Huth et al. evaluó la eficacia antimicrobiana del acuoso (1.25–20 µg mL⁻¹) y ozono gaseoso (1–53 g m³) como antiséptico contra patógenos endodónticos en suspensión y en biopelícula; Se concluyó que a altas concentraciones de ozono gaseoso y acuoso tenían un efecto dependiente de la dosis, la tensión y el tiempo en la destrucción de los microorganismos de prueba en forma de suspensión y biopelícula.

Incluso en bajas concentraciones, el ozono (0,1-0,3 ppm) podría matar completamente las bacterias de prueba en forma planctónica después de 15 o 30 minutos de tiempo de contacto. El ozono gaseoso demostró ser más efectivo que el láser KTP. (Kishen, A., 2015).

Algunos estudios mostraron que el agua ozonada era efectiva contra los microorganismos orales gran-positivos y gram-negativos, así como la *Candida albicans*. Así mismo. Tiene una alta biocompatibilidad (agua ozonada) en las células epiteliales humanas, células fibroblastos gingivales, células periodontales. (Lynch E., 2009)

Hay pruebas contradictorias de la eficacia antimicrobiana del ozono en entornos *in vitro*; sin embargo, hay algunas pruebas de que el ozono (tanto en fase gaseosa como acuosa) es un agente desinfectante potencialmente eficaz para eliminar las biopelículas y los microorganismos relacionados, como *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y

Candida spp. del sistema de agua de la unidad dental y un agente bactericida eficaz para eliminar S. mutans, Staphylococcus aureus resistente a la meticilina, Candida albicans y E. faecalis de las dentaduras postizas (Azarpazhooh A y Limeback H, 2008)

5. Materiales y Métodos



5.1 Preparación de medio Infusión Brain-Heart

Se colocaron en un matraz 3g de polvo de Brain Heart Infusion (BHI) con 100 ml de agua. (El polvo debe ser peso exacto sin influencia del aire en la báscula). Se tapó posteriormente la salida con aluminio y cinta testigo. Se realizaron movimientos rotatorios hasta que la mezcla se vea homogénea. Al tener la mezcla homogénea, se esterilizó en autoclave en ciclo convencional. Posteriormente, se procedió a la activación de las cepas.

5.2 Cepas microbianas y condiciones de cultivo.

En diferentes tubos estériles de 15 ml, se colocaron 10 ml de BHI y se depositó una colonia de *Enterococcus faecalis* (ATCC 114420) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 53978) fue colocado en incubadora durante 18 horas, para su posterior uso.

5.3 Inducción del ozono en cepas microbianas ATCC

Pasadas las 18 horas, se procedió a la aplicación de O₃ (Aquapure *Ozone technology*) a una concentración de 60 µg/mL. La bacteria en el tubo de ensayo activada se llevó al vortex que es

un agitador usado para mezclar y homogenizar la turbidez presente, ya que en reposo se forma un precipitado. Se realizó una dilución como control, con 10 ml de BHI y 100 μ L de precultivo de 18 hrs, en un tubo de ensayo estéril, posteriormente con una micropipeta se colocó 100 μ L de la dilución bacteriana en 6 tubos de ensayo. En proximidad con los tubos se colocó el aparato de O₃ y la manguera que conecta con él se colocó en su extremo la pipeta Pasteur de vidrio y por el que salió el O₃. Los tubos fueron inducidos con O₃ directo a diferentes tiempos, (120 s, 180 s, 240 s, 300 s, 420 s, 600 s) se colocó la pipeta al contacto con la sustancia hasta concluir su tiempo, y fueron previamente cerrados e incubados por 24 hrs.

5.4 Actividad antimicrobiana de ozonoterapia sobre el crecimiento de las cepas microbianas (*E.faecalis* y *P. gingivalis*) por densidad óptica.

Transcurridas las 24hrs, se sacaron los tubos de la incubadora. Se encendió mechero y se procedió a la colocación de guantes (A partir de aquí todo se realizó en proximidad al fuego del mechero para asegurar menor probabilidad de contaminación del experimento). Con una micropipeta se colocó en una placa de 48 pozos, 100 ml de muestra de cada tubo en orden de tiempo y en fila de los primero 5 pozos, entre cada tubo se realizó recambio de puntas de micropipetas. Posteriormente se analizó en una lectora de placas de 48 pozos a 495 nm y los datos obtenidos fueron analizados para obtener el porcentaje de viabilidad celular.

5.5 Selección-preparación de dientes unirradiculares extraídos e inoculación de cultivo mixto para formación de biofilm intrarradicular.

Para este estudio se seleccionaron 31 dientes humanos unirradiculares extraídos. La longitud de trabajo se determinó utilizando una lima k de tamaño 10, hasta 1 mm por debajo del foramen

apical. Los dientes se instrumentaron con la técnica Eflex-Blue (45/04). Los dientes se irrigaron con 2 ml de NaOCl 5.25% en cada cambio de lima, posteriormente se esterilizaron y se inocularon en cada uno de los conductos cultivo mixto (*E.faecalis*, *gordoni*, *Pg*, *Candida albicans*), se cultivaron por 7 días a 37°C en Brain Heart infusion respectivamente. Previamente a la inducción de tratamientos se colocaron cada uno de los dientes en silicona pesada para su manipulación. Los dientes se asignaron aleatoriamente a 3 grupos experimentales siendo el primero 1 diente grupo control (3), se irrigó con 10 ml de solución salina estéril.

En el grupo de Hipoclorito de Sodio (NaOCl), Los conductos radiculares de 15 dientes se irrigaron con 10 ml de solución de NaOCl al 2.5%. En el grupo de ozono, los dientes se dividieron en 3 grupos de 5(c/u). Se aplicó solución salina estéril previamente ozonizada y se indujo directamente el ozono gaseoso con un generador ozono (Aquapure *Ozone technology*) a 60 ug/mL durante 60, 120, 180 s. Después se colocó solución salina en el conducto estéril y se realizó una instrumentación o un limado con la lima master para desprender tejido dentinario, realizando movimientos de cepillado en todo el conducto, posteriormente se introdujeron 2 puntas de papel estériles para recolectar el tejido desprendido con el limado, una vez que se tome la muestra las puntas de papel estériles se colocaron en un tubo Eppendorf con 1 ml de infusión cerebro corazón (BHI) y se incubaron durante 24 a 72 hrs a 37°C; Donde posteriormente se tomó con una micropipeta en una placa de 48 pozos, 100 ml de muestra de cada tubo en orden de Grupos y subgrupos, siendo analizados así en una lectora de placas de 48 pozos a 600 nm y los datos obtenidos fueron escaneados para obtener el porcentaje de viabilidad celular por Unidad formadora de colonia.

5.7 Determinación de la actividad antibiofilm del ozono sobre el crecimiento del cultivo mixto por el ensayo de viabilidad celular "Live/Dead".

Primero se cultivó el biofilm en una placa de cultivo adecuada hasta que alcanzaron la confluencia deseada. A continuación, se procedió a dividir por secciones los tres grupos experimentales previamente mencionados, y después se lavaron las células suavemente con PBS para eliminar el medio de cultivo y los residuos.

Se preparó la solución de ensayo Live/Dead según las instrucciones del fabricante, posteriormente se añadió la solución de ensayo a las células en la placa de cultivo. La cantidad de solución debe ser suficiente para cubrir las células completamente.

Se incubaron las células con la solución de ensayo en condiciones de cultivo (por lo general, a 37°C y 5% de CO₂) durante 15-30 minutos, dependiendo de las recomendaciones del fabricante.

Se observaron las células bajo un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados. las células vivas aparecieron fluorescentes en verde debido a la conversión de Calceína AM. Las células muertas aparecieron fluorescentes en rojo debido a la penetración y unión del PI al ADN.

Se tomaron imágenes y se usó un software de análisis para cuantificar el número de células vivas y muertas. Se calculó la viabilidad celular (porcentaje de células vivas respecto al total) utilizando el conteo manual o automático de las células fluorescentes.

5.8 Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante una prueba de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente se utilizó la prueba paramétrica de ANOVA con Tukey HSD para evaluar el efecto del O₃ y establecer las diferencias entre grupos. Todas las pruebas estadísticas se consideraron significativamente $\alpha = 0.05$.

6. Resultados

Para alcanzar nuestros objetivos, se realizaron experimentos in vitro utilizando cultivos de bacterias aisladas de *E. faecalis* y *P. gingivalis*, los cuales fueron expuestos a ozonoterapia en diferentes intervalos de tiempo (60 s, 120 s, 180 s, 240 s, 300 s, 420 s y 600 s). De la misma manera para tener una réplica similar a lo que sería el uso del ozono en paciente, se evaluó el efecto de la ozonoterapia sobre la formación de biofilm (cultivo mixto) intraconducto en dientes unirradiculares. Los resultados fueron analizados mediante técnicas microbiológicas y estadísticas para determinar la eficacia del ozono en cada uno de los escenarios ya planteados.

6.1 Efecto de la Ozonoterapia sobre *E.faecalis* y *P. gingivalis*

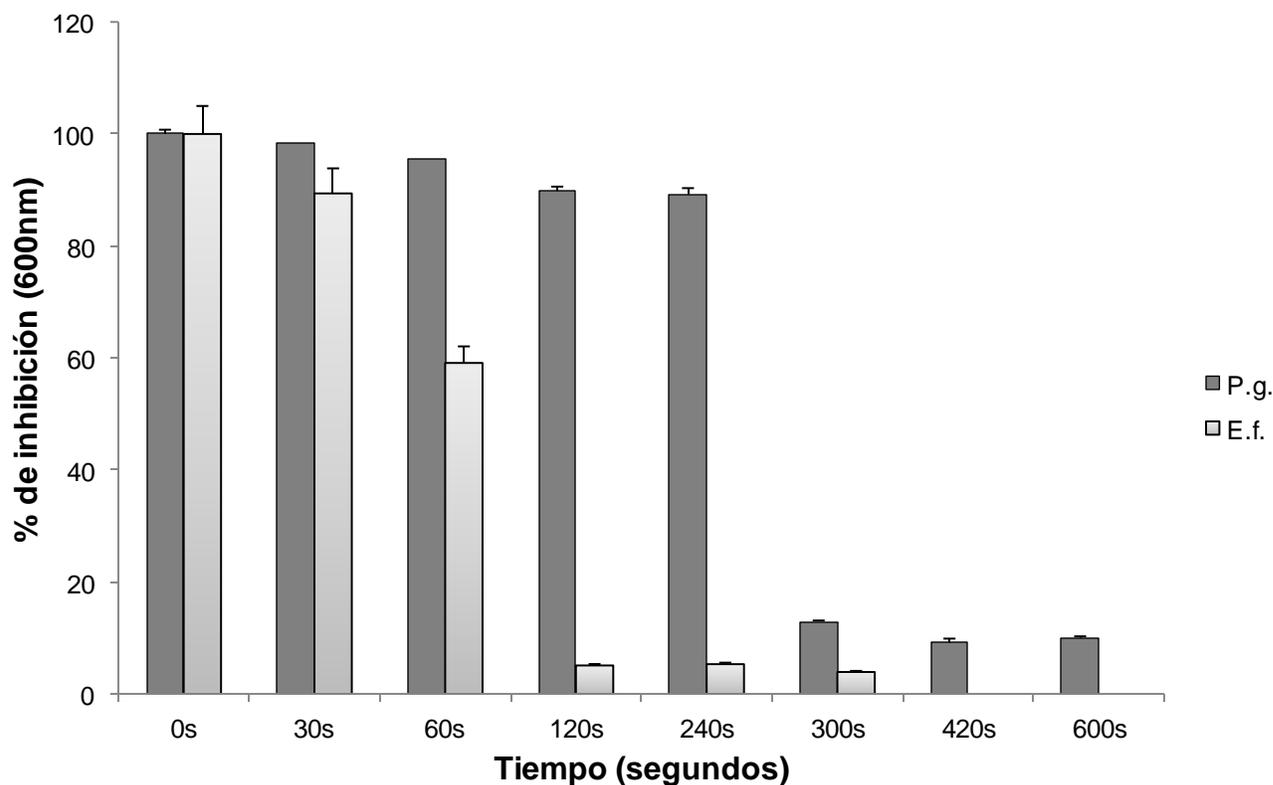


Ilustración 4 Gráfico de viabilidad de *E.faecalis* y *P. gingivalis* tras diferentes minutos de exposición.

La ozonoterapia redujo de forma significativa el crecimiento de *E. faecalis* en diferentes tiempos de exposición del 70% a partir de los 2 minutos de exposición en una bacteria Gram positiva, y a una exposición mayor dentro de los 4 y 5 min ya hay una afectación en la Gram negativa.

Prueba Normalidad Shapiro-Wilk				
	Ctrl	O3	NaClO	NaCl
W-stat	0.879197	0.960846	0.952447	0.894352
p-value	0.305686	0.81386	0.754656	0.37946
alpha	0.05	0.05	0.05	0.05
normal	yes	yes	yes	yes

Estadística descriptiva				
	Ctrl	O3	NaClO	NaCl
Mean	1.2104	0.0744	0.0434	1.1418
Standard Error	0.04332	0.00051	0.000927	0.004042
Median	1.166	0.074	0.043	1.145
Mode	#N/D	0.074	#N/D	#N/D
Standard Deviation	0.096867	0.00114	0.002074	0.009039
Sample Variance	0.009383	1.3E-06	4.3E-06	8.17E-05
Kurtosis	0.019349	-0.17751	-1.96322	-1.39153
Skewness	1.103732	0.404796	0.235514	-0.75318
Range	0.233	0.003	0.005	0.021
Maximum	1.359	0.076	0.046	1.15
Minimum	1.126	0.073	0.041	1.129
Sum	6.052	0.372	0.217	5.709
Count	5	5	5	5
Geometric Mean	1.207398	0.074393	0.043361	1.141771
Harmonic Mean	1.204498	0.074386	0.043321	1.141743
AAD	0.07768	0.00088	0.00168	0.00744
MAD	0.04	0.001	0.002	0.005
IQR	0.111	0.001	0.003	0.013

Tabla ANOVA de un factor								
Sources	SS	df	MS	F	P value	Eta-sq	RMSSE	Omega Sq
Between Groups	6.254847	3	2.084949	880.5984	0.0000	0.99397997	13.2710092	0.992478
Within Groups	0.037882	16	0.002368					
Total	6.292729	19	0.331196					

TUKEY HSD/KRAMER			alpha	0.05	
group	mean	n	ss	df	q-crit
Ctrl	1.2104	5	0.037533		
O3	0.0744	5	5.2E-06		
NaClO	0.0434	5	1.72E-05		
NaCl	1.1418	5	0.000327		
		20	0.037882	16	4.046

Tukey HSD comparación entre grupos									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Ctrl	O3	1.136	0.021761	52.2041	1.047956	1.224044	0.00000	0.088044	23.34638
Ctrl	Na-CIO	1.167	0.021761	53.62868	1.078956	1.255044	0.00000	0.088044	23.98347
Ctrl	NaCl	0.0686	0.021761	3.152466	-0.01944	0.156644	0.15752	0.088044	1.409826
O3	Na-CIO	0.031	0.021761	1.424584	-0.05704	0.119044	0.74749	0.088044	0.637093
O3	NaCl	1.0674	0.021761	49.05163	0.979356	1.155444	0.00000	0.088044	21.93656
NaClO	NaCl	1.0984	0.021761	50.47621	1.010356	1.186444	0.00000	0.088044	22.57365

6.2 Efecto de la ozonoterapia sobre el cultivo mixto

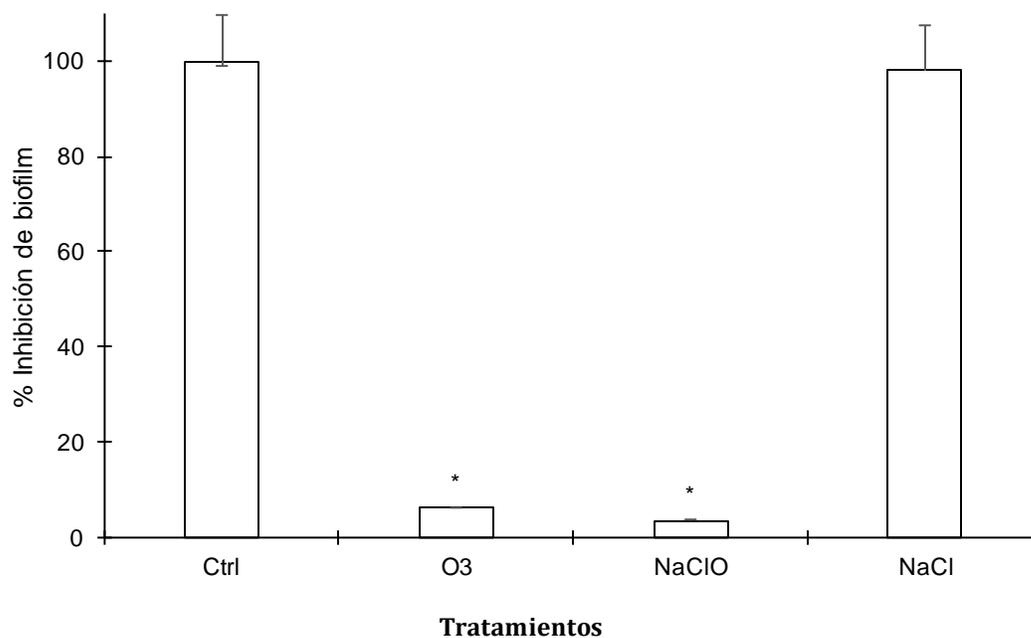


Ilustración 5 Viabilidad microbiana en el cultivo mixto tras la ozonoterapia

Para medir el efecto antibiofilm sobre dentina, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 570nm. EL tratamiento con O₃ a 60ug/ml mostró diferencias significativas ($p < 0.0001$) con el control negativo y con el NaCl 0.09%. (tratadas solo con solución salina) confirmó la presencia de un biofilm denso en los conductos antes de los diferentes tratamientos. Hubo una similitud significativa entre los 5 grupos ($p < .0001$). En general, el hipoclorito de sodio al 2.5% fue el agente desinfectante más efectivo junto con el ozono combinado con solución salina previamente ozonizada.

En el grupo de control positivo, la exposición al hipoclorito de sodio al 2.5% durante 1 min produjo una reducción del 90% en las unidades formadoras de colonias viables (UFC) en comparación con el control negativo de solución salina, mientras que la inducción de ozono gaseoso directo en conjunto con la solución salina tratada con ozono previamente produjo una reducción similar a la del hipoclorito en 3 min de exposición.

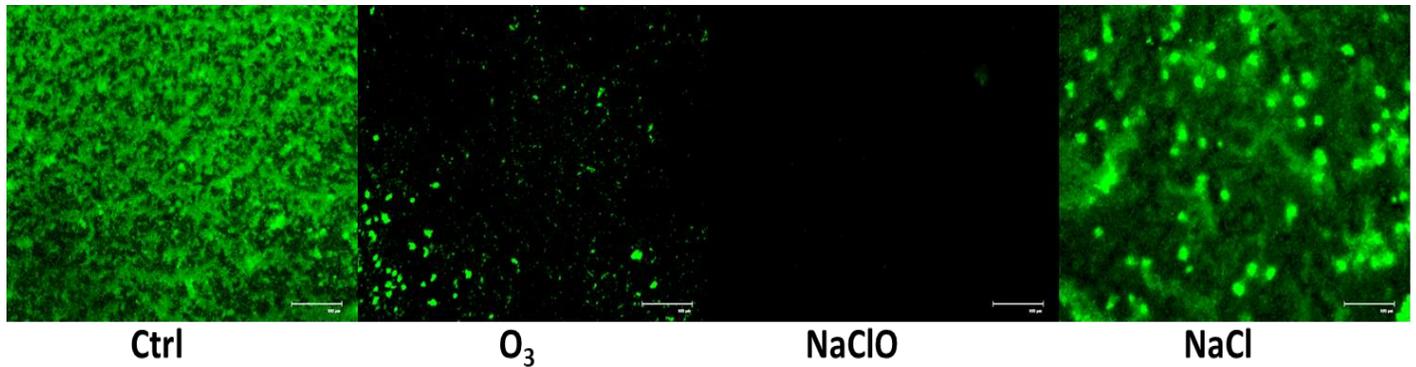


Figura 7. Actividad bactericida del ozono sobre el crecimiento del cultivo mixto por el ensayo de viabilidad celular "Live/Dead".

Por medio de los resultados arrojados en el ensayo Live/Dead indican que la ozonoterapia es efectiva contra *E.faecalis* y *P. gingivalis* y muestra un notable efecto antibiofilm sobre la superficie de dentina. Estos hallazgos sugieren que la ozonoterapia puede ser una herramienta prometedora dentro del protocolo de irrigación y desinfección en el tratamiento endodóntico.

7. Discusión

El presente estudio se evaluó la acción antibiofilm del ozono gaseoso directo con solución salina previamente ozonizada contra un biofilm establecido en conductos unirradiculares. Los resultados mostraron una reducción significativa de la carga bacteriana en comparación con los grupos de control.

Según Malik, et al., (2020), la solución salina previamente ozonizada y el NaOCl al 2,5% tienen la misma eficacia antimicrobiana y el ozono es menos citotóxica. Los resultados del presente estudio indicaron que la ozonoterapia, en combinación con la solución salina ozonizada, es eficaz para reducir la viabilidad bacteriana en biofilms complejos, aunque no garantiza una desinfección total. La capacidad del ozono para penetrar y desinfectar áreas difíciles de alcanzar sugiere que puede ser una herramienta valiosa en la odontología endodóntica, especialmente como complemento a los métodos tradicionales de desinfección.

Khademi A et al. (2007), Cai, C., et al. (2023), describen que el hipoclorito de sodio (NaOCl) es una de las soluciones irrigantes más usadas dentro del tratamiento endodóntico por su acción antimicrobiana. En el presente estudio, el grupo control positivo que utilizó NaOCl también logró una eliminación total de las bacterias, reafirmando su eficacia.

Los hallazgos de esta investigación coinciden con un estudio de Araujo CO et al. (2024), que muestra que la ozonoterapia combinada con tratamientos convencionales es eficaz en la reducción del dolor postoperatorio y mejora la desinfección, pero no es superior al NaOCl para eliminar biofilms complejos.

Además, un estudio de Estrela et al. (2007) también comparó la eficacia del ozono y del NaOCl en la desinfección de conductos radiculares, encontrando que, aunque ambos tratamientos eran efectivos, el NaOCl tenía una ventaja significativa en la eliminación completa de las bacterias. Este estudio refuerza la necesidad de seguir investigando combinaciones o secuencias de tratamientos que puedan potenciar la acción antimicrobiana del ozono.

En contraste, algunos estudios recientes, como el de Oizumi et al. (2022), han explorado la combinación de ozono con otros agentes antimicrobianos, mostrando resultados prometedores en la reducción de biofilms. Estos estudios sugieren que la combinación de tratamientos puede ser una estrategia eficaz para superar las limitaciones de la ozonoterapia sola.

Hems et al. (2005), se evaluó la eficacia del ozono en la desinfección de biofilms en conductos radiculares, demostrando que el ozono puede ser una alternativa viable, pero resaltaron la necesidad de ajustar la concentración y el tiempo de exposición para optimizar su eficacia; por contrario en nuestro estudio se realizó a una dosis mayor de 60 ug/mL, en diferentes tiempos de exposición, demostrando un buen efecto antibiofilm.

En el artículo de Barbosa BPNP et al., (2023), se señaló que el ozono puede ser beneficioso como complemento en tratamientos endodónticos específicos, especialmente en combinación con ultrasonidos o láser para mejorar la desinfección del conducto radicular; Sin embargo, no reemplaza al NaOCl como el estándar de oro en endodoncia.

La incorporación de la ozonoterapia en los protocolos de desinfección endodóntica podría ofrecer una alternativa menos agresiva y con menos efectos secundarios en comparación con el hipoclorito de sodio.

La ozonoterapia también ha demostrado ser una alternativa óptima en el tratamiento de ápices abiertos. Un estudio realizado por Gupta et al. (2011) mostró que la aplicación de ozono en dientes con ápices abiertos no solo ayudó a la desinfección sino también a la estimulación de la cicatrización periapical. Este enfoque es particularmente útil en casos donde el sellado apical es complicado, ofreciendo una opción terapéutica menos invasiva y más efectiva en comparación con los métodos tradicionales.

Estos hallazgos tienen implicaciones significativas para la práctica clínica, ya que sugieren que la ozonoterapia puede ser una herramienta complementaria eficaz, especialmente en casos donde la resistencia bacteriana a agentes convencionales representa un desafío. Este estudio presenta algunas limitaciones, entre las cuales se incluyen el tamaño de la muestra y la variabilidad en las condiciones experimentales que pueden influir en la reproducibilidad de los resultados. Además, la evaluación se limitó a un entorno de laboratorio, lo cual puede no reflejar completamente las condiciones clínicas reales.

Futuros estudios deberían enfocarse en evaluar la efectividad de la ozonoterapia en condiciones clínicas diversas y con muestras más grandes. Asimismo, sería valioso investigar la combinación de ozonoterapia con otros agentes desinfectantes para determinar si se pueden lograr efectos sinérgicos en la eliminación de biofilm. En conclusión, aunque el hipoclorito de sodio sigue siendo el desinfectante más efectivo para los conductos radiculares, la ozonoterapia emerge como una prometedora alternativa, especialmente en casos específicos como los ápices abiertos, donde su capacidad para promover la cicatrización y reducir el dolor postoperatorio puede ofrecer ventajas significativas sobre otras modalidades de tratamiento, incluyendo la terapia con láser. Estos resultados abren la puerta a futuras investigaciones y potenciales aplicaciones clínicas de la ozonoterapia en endodoncia.

8. Conclusiones

La ozonoterapia mostró ser eficaz en la reducción significativa de la carga bacteriana en los biofilms presentes en los conductos radiculares. Sin embargo, no se logró una eliminación completa del biofilm en ninguno de los grupos experimentales. Esto sugiere que, aunque el ozono tiene un notable efecto antimicrobiano, no es suficiente por sí solo para garantizar una desinfección total de los conductos radiculares infectados.

El hipoclorito de sodio (NaOCl) demostró ser el agente más efectivo, logrando una eliminación total de las bacterias en el grupo control positivo. Esto refuerza su posición como el estándar de oro en la desinfección de conductos radiculares. La comparación directa con el NaOCl subraya la necesidad de combinar la ozonoterapia con otros agentes antimicrobianos o métodos para alcanzar niveles de desinfección comparables.

A pesar de no alcanzar la eliminación total del biofilm, la capacidad del ozono para reducir significativamente la carga bacteriana indica su potencial como tratamiento complementario en la endodoncia. La ozonoterapia puede ser especialmente útil en combinación con otros métodos de desinfección, mejorando la eficacia global del tratamiento endodóntico.

El uso de ozono en odontología ofrece varias ventajas, incluyendo su carácter menos agresivo comparado con el NaOCl y la reducción de efectos secundarios adversos. La ozonoterapia podría ser una alternativa viable y segura para pacientes con sensibilidad a los agentes químicos más fuertes.

9. LITERATURA CITADA

1. Araujo CO, Macêdo AFL de, Sant'Anna Junior A. Main findings from the use of ozone therapy alone or combined with conventional treatments in root canal treatment: a systematic review. *MedNEXT* [Internet]. 2024 Aug. 28 [cited 2024 Oct. 17];5(S3).
2. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent*. 2008 Feb;36(2):104-16.
3. Azim AA, Azim KA, Deutsch AS, Huang GT. Acquisition of anatomic parameters concerning molar pulp chamber landmarks using cone-beam computed tomography. *J Endod*. 2014 Sep;40(9):1298-302.
4. Barbosa BPNP, Alcalá MH, Castro FPL de. Major clinical findings on the safety and effectiveness of ozone therapy in endodontic treatment: a concise systematic review. *MedNEXT* [Internet]. 2023 Oct. 28 [cited 2024 Oct. 17];4(S4).
5. Bharti R, Chandra A, Tikku AP, Wadhvani KK. "Taurodontism" an endodontic challenge: a case report. *J Oral Sci*. 2009 Sep;51(3):471-4.
6. Bolger WL, Schindler WG. A mandibular first molar with a C-shaped root configuration. *J Endod*. 1988 Oct;14(10):515-9.
7. Cai C, Chen X, Li Y, Jiang Q. Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment. *Biomed Res Int*. 2023 Jan 13;2023:8858283.
8. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod*. 2002 Jan;28(1):17-9.
9. Candeiro GTM, de Menezes AST, de Oliveira ACS, Alves FRF. Successful nonsurgical treatment of type II dens invaginatus with 5 root canals using a self-adjusting file: a case report. *Restor Dent Endod*. 2023 Apr 27;48(2):e17.
10. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):523-6.
11. Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod*. 2007 Jun;33(6):652-62.
12. Chow TW. Mechanical effectiveness of root canal irrigation. *J Endod*. 1983 Nov;9(11):475-9.

13. Debicka P, Lipski M, Buczkowska-Radlińska J, Trusewicz M. Biofilm w kanałach korzeniowych w świetle piśmiennictwa [Biofilm formation on root canal--review]. *Ann Acad Med Stetin*. 2008;54(1):152-6.
14. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):815-8.
15. El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Apr;103(4):560-9.
16. Fan B, Cheung GS, Fan M, Gutmann JL, Bian Z. C-shaped canal system in mandibular second molars: Part I--Anatomical features. *J Endod*. 2004 Dec;30(12):899-903.
17. Fernandes M, de Ataide I, Wagle R. C-shaped root canal configuration: A review of literature. *J Conserv Dent*. 2014 Jul;17(4):312-9.
18. Gonçalves LS, Rodrigues RC, Andrade Junior CV, Soares RG, Vettore MV. The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials. *J Endod*. 2016 Apr;42(4):527-32.
19. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J*. 2014 Mar;216(6):299-303.
20. Hess, W. (1921). Formation of Root-Canals in Human Teeth11“Zur Anatomie der Wurzelkanäle des menschliches Gebisses,” *Schweizerische Vierteljahrsschrift für Zahnheilkunde*, 1917. Translated by Newton G. Thomas, A.B., M.A., D.D.S., and Herman Redlich, Chicago, Illinois. *The Journal of the National Dental Association*, 8(9), 704–734.
21. Holtzman L. Root canal treatment of mandibular second premolar with four root canals: a case report. *Int Endod J*. 1998 Sep;31(5):364-6.
22. Huang CS, Hsiao CH, Chang YC, Chang CH, Yang JC, Gutmann JL, Chang HC, Huang HM, Hsieh SC. A Novel Endodontic Approach in Removing Smear Layer Using Nano and Submicron Diamonds with Intracanal Oscillation Irrigation. *Nanomaterials (Basel)*. 2023 May 15;13(10):1646.
23. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015 Jan-Feb;5(1):1-12.
24. Kanagasingham S, Blum IR. Sodium Hypochlorite Extrusion Accidents: Management and Medico-Legal Considerations. *Prim Dent J*. 2020 Dec;9(4):59-63.

25. Khademi A, Usefian E, Feizianfard M. Tissue dissolving ability of several endodontic irrigants on bovine pulp tissue. *Iran Endod J.* 2007 Summer;2(2):65-8. Epub 2007 Jul 5.
26. Kishen, A. (2015). Advanced Therapeutic Options to Disinfect Root Canals. *The Root Canal Biofilm*, 327–355.
27. Kottoor J, Albuquerque D, Velmurugan N, Kuruvilla J. Root anatomy and root canal configuration of human permanent mandibular premolars: a systematic review. *Anat Res Int.* 2013;2013:254250.
28. Krasner P, Rankow HJ. Anatomy of the pulp-chamber floor. *J Endod.* 2004 Jan;30(1):5-16.
29. Kreth, J. y & Herzberg, M. C. Molecular Principles of Adhesion and Biofilm Formation. *The Root Canal Biofilm*, 2015; 23–53.
30. Lynch E. Comment on "The application of ozone in dentistry: A systematic review of the literature". *J Dent.* 2009 May;37(5):406-10; author reply 411-2.
31. Malik, Tamanna; Kaura, Sameer¹; Kakria, Prachi². Dental Ozone: A Boon for Dentistry. *Indian Journal of Dental Sciences* 12(1):p 49-52, Jan–Mar 2020.
32. Martin H. Cleanliness, disinfection, and sterilization of the root canal. *Curr Opin Dent.* 1991 Dec;1(6):734-6.
33. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009 Apr;42(4):288-302.
34. Mustafa M, Attur K, Bagda KK, Singh S, Oak A, Kathiria N. An Appraisal on Newer Endodontic File Systems: A Narrative Review. *J Contemp Dent Pract.* 2022 Sep 1;23(9):944-952.
35. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod.* 2004 Nov;30(11):778-81.
36. Nunes IA, Novais TM, Garcia PP, Silva WS, Tavares RJ, Rizzi CC, Carvalho CN, Filho EM. Antimicrobial action of ozonated water and photodynamic therapy with sonic activation in root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J Clin Exp Dent.* 2022 Jun 1;14(6):e486-e491.
37. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod.* 1985 Dec;11(12):525-8.
38. Pawar AM, Singh S. New classification for pulp chamber floor anatomy of human molars. *J Conserv Dent.* 2020 Sep-Oct;23(5):430-435.

39. Priddy WL, Carter HG, Auzins J. Dens evaginatus--an anomaly of clinical significance. *J Endod.* 1976 Feb;2(2):51-2.
40. Regan JD, Fleury AA. Irrigants in non-surgical endodontic treatment. *J Ir Dent Assoc.* 2006 Autumn;52(2):84-92.
41. Ribeiro AC, Matarazzo F, Favari M, Zezell DM, Mayer MP. Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *J Endod.* 2011 Jul;37(7):922-6.
42. Roslan AA, Rahman NA, Alam MK. Dental anomalies and their treatment modalities/planning in orthodontic patients. *J Orthod Sci.* 2018 Sep 6;7:16.
43. Rossi-Fedele G, Dođramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod.* 2012 Apr;38(4):426-31.
44. Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, Sang-Ngoen T, Garami A, Mikó A, Varga G, Lohinai Z. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Endod.* 2020 Aug;46(8):1032-1041.e7.
45. Sarkar S, Rao AP. Number of root canals, their shape, configuration, accessory root canals in radicular pulp morphology. A preliminary study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2002 Sep;20(3):93-7.
46. Sceiza MF, Daniel RL, Santos EM, Jaeger MM. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *J Endod.* 2001 Dec;27(12):741-3.
47. Sella Tunis T, Sarne O, Hershkovitz I, Finkelstein T, Pavlidi AM, Shapira Y, Davidovitch M, Shpack N. Dental Anomalies' Characteristics. *Diagnostics (Basel).* 2021 Jun 25;11(7):1161.
48. Sen S, Sen S. Ozone therapy a new vista in dentistry: integrated review. *Med Gas Res.* 2020 Oct-Dec;10(4):189-192.
49. Silveira CMM, Pimpão MV, Fernandes LA, Westphalen VPD, Cavenago BC, Carneiro E. Influence of Different Irrigation Solutions and Instrumentation Techniques on the Amount of Apically Extruded Debris. *Eur Endod J.* 2019 Nov 19;4(3):122-126.
50. Spencer HR, Ike V, Brennan PA. Review: the use of sodium hypochlorite in endodontics--potential complications and their management. *Br Dent J.* 2007 May 12;202(9):555-9.

51. Van der Sluis, L., Boutsoukis, C., Jiang, L.-M., Macedo, R., Verhaagen, B., & Versluis, M. (2015). Root Canal Irrigation. *The Root Canal Biofilm*, 259–301.
52. Versiani, M. A., & Ordinola-Zapata, R. (2015). Root Canal Anatomy: Implications in Biofilm Disinfection. *The Root Canal Biofilm*, 155–187.
53. Vertucci F, Seelig A, Gillis R. Root canal morphology of the human maxillary second premolar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1974 Sep;38(3):456-64.
54. Vertucci, F. J. Root canal morphology and its relationship to endodontic procedures. *Endodontic Topics*, 2005; 10(1), 3–29.
55. Vivekananda Pai AR. Factors influencing the occurrence and progress of sodium hypochlorite accident: A narrative and update review. *J Conserv Dent*. 2023 Jan-Feb;26(1):3-11.
56. Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. *J Endod*. 1995 Dec;21(12):592-3.
57. Young GR, Parashos P, Messer HH. The principles of techniques for cleaning root canals. *Aust Dent J*. 2007 Mar;52(1 Suppl):S52-63.
58. Zan R, Hubbezoglu I, Sümer Z, Tunç T, Tanalp J. Antibacterial effects of two different types of laser and aqueous ozone against *Enterococcus faecalis* in root canals. *Photomed Laser Surg*. 2020 Apr;31(4):150-4.
59. Zandi H, Petronijevic N, Mdala I, Kristoffersen AK, Enersen M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Ørstavik D. Outcome of Endodontic Retreatment Using 2 Root Canal Irrigants and Influence of Infection on Healing as Determined by a Molecular Method: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2019 Sep;45(9):1089-1098.e5.
60. Zarean P, Özcan M, Molaie M, Mortaheb A, Al-Haj Husain N, Molaeinasab H, Zare Jahromi M, Zarean P. Comparative Evaluation of Apically Extruded Debris During Root Canal Preparation Using Three Different File Systems Applied Under 2.5% Sodium Hypochlorite or 2% CHX Irrigation. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2023 May 23.
61. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006 May;32(5):389-98.