

**COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE UN COMPUESTO DE ÁCIDO SULFÓNICO/SULFÚRICO CON
IRRIGANTES CONVENCIONALES SOBRE *Enterococcus faecalis* EN UN MODELO DE BIOFILM *in*
vitro.**

DIANA MARCELA GUTIÉRREZ SALDAÑA

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC - JULIO - 2020**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Maestría en Ciencias Odontológicas
Título:	Comparación de la eficacia de un compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico con irrigantes convencionales sobre <i>enterococcus faecalis</i> en un modelo de biofilm <i>in vitro</i> .
Grupo de Investigación	Instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral)
Línea de investigación:	Microbiología Oral
Tipo de investigación:	Maestría /Grupo
Estudiante:	Diana Marcela Gutiérrez Saldaña
Director:	Diana Marcela Castillo Perdomo
Codirectores :	Yormaris Castillo Romero
Análisis estadístico:	Diana Marcela Gutiérrez Saldaña
Asesor estadístico	Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

TIANA CIAN LEAL	Presidente del Claustro
CAMILO ALBERTO ESCOBAR JIMÉNEZ	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Directora Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
MARIA CONSUELO ROMERO	Director(a) Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas
ANGELA VICTORIA FONSECA BENITEZ	Coordinador(a) Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios y la Virgen María, por concederme una vida llena de oportunidades y permitir levantarme cada día, iluminando y guiando mí camino.

A mis padres y hermano, por su apoyo incondicional frente a todos los sueños y metas que me he propuesto a lo largo de la vida, además por no dejarme desfallecer ante las adversidades, a su vez enseñarme a tener fortaleza, templanza y la mejor actitud ante estas situaciones y lo más importante su amor y fe en mí.

A mis amigos por su compañía, cariño y amistad incondicional, permaneciendo ante los buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis Diana Marcela Castillo Perdomo y Yormaris Castillo Romero. Por todo su tiempo, consejo, apoyo, confianza, generosidad, paciencia y dedicación en este proceso, por compartir a través de su excelente enseñanza sus conocimientos y amplia experiencia, este nuevo conocimiento que me permite fortalecer mis competencias profesionales y convertirme en una persona con mejores cualidades para aportar a la sociedad.

A Gloria Inés Lafaurie Villamil, por ser la persona que creyó en mi desde el primer momento y darme la oportunidad de desarrollar este proyecto de investigación, por todo su conocimiento y guía durante mi proceso académico y colocar en mi camino de formación a las personas más idóneas para este fin.

A la Universidad El Bosque, al instituto UIBO y especialmente al laboratorio de Microbiología Oral, porque se convirtió en mi refugio, mi hogar y entorno perfecto para aprender el trabajo estricto y riguroso de un laboratorio, sin desligar la parte humana y cálida de cada una de sus integrantes, que llegaron a convertirse en mucho más que en compañeras incondicionales, son personas muy especiales de quienes sigo aprendiendo cada día. Especialmente agradezco a Nathaly Delgadillo y Yineth Neuta por su colaboración, apoyo y ayuda en cada momento.

Al Laboratorio de Microscopia de la Universidad de los Andes, por abrirme las puertas, a sus integrantes Humberto Ibarra, Mónica López y Juan Camilo Orozco, por siempre tener la mejor disposición, por su excelente calidad humana además de compartir generosamente su tiempo y conocimientos, los cuales aportaron y fortalecieron en gran medida este trabajo.

Agradezco a la Maestría en Ciencias Odontológicas, por su apoyo y todo lo que implicó mi proceso de formación. A mis profesores por todas sus enseñanzas y dedicación para forjar el conocimiento que tengo hoy en día.

Agradezco a Vicerrectora de Investigaciones, por creer en la pertinencia e importancia de este trabajo en la investigación a nivel de Odontología, por lo cual lo apoyó económicamente para el desarrollo de este, PCI-2017-9443.

TABLA CONTENIDO

Resumen

Abstract

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4. JUSTIFICACIÓN	13
5. SITUACIÓN ACTUAL	14
5.1 Fracaso endodónticos y <i>E. faecalis</i>	14
6. OBJETIVOS	16
6.1 Objetivo general	16
6.2 Objetivos específicos	16
7. METODOLOGÍA	17
7.1. Tipo de estudio	17
7.2. Población y muestra	17
7.2.1 Preparación químico-mecánica de los premolares	17
7.3. Condiciones de cultivo de <i>E. faecalis</i>	18
7.4 Modelo de formación de biofilm	19
7.4.1 Verificación de la viabilidad bacteriana después de la formación del biofilm por cultivo	20
7.4.2 Evaluación del biofilm por Microscopía	20
7.5 Evaluación de la eficacia de los irrigantes sobre biofilm mono especie con <i>E. faecalis</i>	22
7.5.1 Evaluación de la eficacia de los irrigantes en la eliminación del biofilm	22
7.5.2 Evaluación de la eficacia de los irrigantes en la inhibición del biofilm	23
7.6. Hipótesis de estudio	23
7.7. Plan de análisis	24
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS	25
8.1 Sustento legal	25
9. RESULTADOS	26
10. DISCUSIÓN	45
11. CONCLUSIONES	52
12. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	53
13. BIBLIOGRAFÍA	54
14. ANEXOS	61

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Recuento bacteriano de <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 expresados en UFC/mL. Tabla diseñada por la Dra. Diana Marcela Castillo Perdomo y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña con supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.	27

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismo de acción del compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico. Interacción de la molécula de agua el grupo sulfato, formando puentes de hidrógeno, principio del DSD (Desiccation Shock Debridement) – Desbridamiento por choque de desecación. Figura realizada por EPIEN medical.	10
Figura 2. Esquema de corte para obtención de ¼ de raíces. Corte eje longitudinal obteniendo semiraíces (A y B), Corte longitudinal en cada semiraíz obteniendo cuatro cuartos de raíz de una raíz (C). Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña. Ilustraciones realizadas por la diseñadora gráfica Sara Mahecha Nieto.	18
Figura 3. Recuento bacteriano en UFC-Log ₁₀ de <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 a partir del biofilm formado en diferentes tiempos de evaluación (7, 14 y 30 días). Valor de p<0.05, **** (p<0.0001). ANOVA y post hoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.	26
Figura 4. Imágenes de formación de biofilm con <i>E. faecalis</i> ATCC 29212. Imágenes A, E, I: Control negativo; imágenes B-D: Biofilm de 7 días de formación en las tres superficies (tercio cervical, medio y apical); imágenes F-H: Biofilm de 14 días de formación en las tres superficies, imágenes J-L: Biofilm de 30 días de formación en las tres superficies radiculares, FE-SEM 12000X. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña, captura de imágenes microscopía electrónica de barrido del servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes, por el instituto.	28
Figura 5. Reconstrucción tridimensional de imágenes de CLMS 40X. Fluorescencia verde corresponde a bacterias viables, fluorescencia roja correspondiente a bacterias no viables. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña de reconstrucciones realizadas con el software IMARIS 8.0, imágenes tomadas por el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes.	30
Figura 6. Porcentaje de viabilidad (%) y biovolumen (μm^3) en cada tiempo evaluado y las tres superficies. A y B: Porcentaje de viabilidad y biovolumen 7 días, C y D: Porcentaje de viabilidad y biovolumen 14 días, E y F: Porcentaje de viabilidad y biovolumen 30 días. Valor de p<0.05. ANOVA de dos vías y post hoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.	31
Figura 7. Porcentaje de viabilidad (%) y biovolumen (μm^3) en cada superficie en los tres tiempos evaluados. A y B: Porcentaje de viabilidad y biovolumen en cervical, C y D: Porcentaje de viabilidad y biovolumen en medio, E y F: Porcentaje de viabilidad y biovolumen en apical. Valor de p<0.05. (* p= 0.01), (** p< 0.005), (**** p< 0.0001). ANOVA de dos vías y post hoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo la supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.	32
Figura 8. Eficacia de los irrigantes en la eliminación del biofilm después de 1 minuto exposición. A: Control de formación de biofilm (BHI), B: Control sin tratamiento (agua), C: Compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, D: CHX 2%, E: EDTA 17%, F: NaOCl 5.25%. FE-SEM 12000X. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña, captura de imágenes de microscopía electrónica de barrido con el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes.	36

Figura 9. Reconstrucción tridimensional de imágenes CLMS 40X. Biofilms después del tratamiento con los irrigantes por 1 minuto. A: Control de formación de biofilm (BHI), B: Control sin tratamiento (agua), C: Compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, D: CHX2%, E: EDTA 17%, F: NaOCl 5.25%. Fluorescencia verde corresponde a bacterias vivas, fluorescencia roja correspondiente a bacterias muertas. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña de reconstrucciones realizadas con el software IMARIS 8.0, imágenes tomadas bajo el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes. 38

Figura 10. Eficacia de los irrigantes BHI, agua, compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico (CASS), CHX 2%, EDTA 17%, NaOCl 5.25%, en la eliminación de biofilm. A: Porcentaje de viabilidad (%), B: Biovolumen (μm^3). Valor $p > 0.05$, ** ($p > 0.001$) **** ($p < 0.0001$). ANOVA de una vía con posthoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo la supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie. 39

Figura 11. Capacidad de los irrigantes en la inhibición de formación del biofilm con previo tratamiento por 1 minuto. A: Control de formación de biofilm (BHI), B: Control sin pretratamiento (agua), C: Compuesto de ácido sulfónico sulfúrico, D: CHX 2%, D: EDTA 17%, E: NaOCl 5.25%. FE-SEM 12000X. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña, captura imágenes de microscopia electrónica de barrido con el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes. 41

Figura 12. Reconstrucción tridimensional de imágenes de CLMS 40X. En $\frac{1}{4}$ de dientes con tratamiento previo por 1 minuto con los irrigantes antes de 14 días de incubación. A: Control de formación de biofilm (BHI), B: Control sin pretratamiento (agua), C: Compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, D: CHX 2%, E: EDTA 17%, F: NaOCl 5.25%. Fluorescencia verde corresponde a viabilidad bacteriana, fluorescencia roja a no viabilidad bacteriana. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña de reconstrucciones realizadas con el software IMARIS 8.0, imágenes tomadas bajo el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes. 44

Figura 13. Capacidad de los irrigantes BHI, agua, compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico (CASS), CHX 2%, EDTA 17%, NaOCl 5.25%, en la inhibición de biofilm. A: Porcentaje de viabilidad (%), B: Biovolumen (μm^3). Valor $p < 0.05$, * ($p = 0.001$) **** ($p < 0.0001$). ANOVA de una vía con posthoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie . 44

RESUMEN

COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE UN COMPUESTO DE ÁCIDO SULFÓNICO/SULFÚRICO CON IRRIGANTES CONVENCIONALES SOBRE *Enterococcus faecalis* EN UN MODELO DE BIOFILM *in vitro*

Introducción: La principal etiología relacionada al fracaso de los tratamientos endodónticos, es la persistencia de microorganismos en los conductos radiculares resistentes a los procedimientos de desinfección. El *E. faecalis*, conforma biofilm mono especie que le confiere resistencia a los irrigantes utilizados en endodoncia. **Objetivo:** Comparar la eficacia de un compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico con irrigantes antimicrobianos usados durante el tratamiento convencional sobre *E. faecalis* en un modelo de biofilm endodóntico *in vitro*. **Metodología:** El biofilm fue estandarizado sobre cuartos de raíz, incubados con inóculo de *E. faecalis* ATCC 29212 a 37°C, sin recambio de medio, evaluado en tres tiempos 7, 14 y 30 días. Durante la estandarización del biofilm, 14 días fue el tiempo más adecuado, posteriormente, los especímenes fueron tratados durante un minuto con compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico, clorhexidina 2%, EDTA 17%, hipoclorito de sodio 5.25% y como control negativo agua para evaluar la eliminación del biofilm. Para evaluar la inhibición, los especímenes fueron pretratados con cada uno de los irrigantes y el control negativo durante un minuto antes de la formación del biofilm durante 14 días. Los biofilm fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido para verificar presencia o ausencia del microorganismo y biofilm sobre la dentina; microscopía láser confocal para determinar viabilidad bacteriana y biovolumen con el kit de viabilidad bacteriana Live/Dead, las imágenes fueron analizadas utilizando el software IMARIS 8.0. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en experimentos independientes, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y dos vías con posthoc y prueba de Tukey p (>0.05). **Resultados:** Se estandarizó un modelo de biofilm mono especie endodóntico con *E. faecalis* sin recambio de medio, de 14 días de incubación, con un biovolumen promedio de 434.496 μm^3 y 75% de viabilidad bacteriana ($p < 0.0001$) en comparación con 7 y 30 días. El compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, tiene la capacidad de eliminar e inhibir el biofilm, afectando significativamente el biovolumen en comparación con los otros irrigantes ($p < 0.001$), sin embargo, no tiene la capacidad de afectar la viabilidad bacteriana ($p > 0.05$). **Conclusión:** El compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico disgrega el biofilm, pero permite la persistencia de bacterias viables.

PALABRAS CLAVE: *Enterococcus faecalis*, biofilm, terapia del conducto radicular, desinfección, desecación.

ABSTRACT

COMPARISON OF THE EFFICACY OF A SULPHONIC / SULFURIC ACID COMPOUND WITH CONVENTIONAL IRRIGANTS ON *Enterococcus faecalis* AN *in vitro* BIOFILM MODEL

Background: The main etiology related to the failure of endodontic treatments is the persistence of microorganisms in the root canals resistant to disinfection procedures. *E. faecalis* is a monospecies biofilm that confers resistance to irrigants used in endodontics. **Aim:** To compare the efficacy of a sulfonic / sulfuric acid compound with antimicrobial irrigants used during conventional treatment on *E. faecalis* in an *in vitro* endodontic biofilm model. **Methodology:** The biofilm was standardized on root quarters, incubated with inoculum of *E. faecalis* ATCC 29212 at 37 ° C, without medium change, evaluated in three times 7, 14 and 30 days. During the biofilm standardization, 14 days was the most appropriate time, subsequently, the specimens were treated for one minute with a compound of sulfonic / sulfuric acid, 2% chlorhexidine, 17% EDTA, 5.25% sodium hypochlorite and as negative control water to assess biofilm removal. To assess the inhibition, the specimens pre-treated with each of the irrigants and the negative control for one minute, the biofilm formed for 14 days. The biofilms analyzed by scanning electron microscopy to verify the presence or absence of the microorganism and biofilm on the dentin; confocal laser microscopy to determine bacterial viability and biovolume with the Live / Dead bacterial viability kit, the images were analyzed using IMARIS 8.0 software. All experiments performed in triplicate in independent experiments, one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) performed with posthoc and the Tukey p test (> 0.05). **Results:** An endodontic monospecies biofilm model was standardized with *E. faecalis* without medium exchange, of 14 days of incubation, with an average biovolume of 434,496 μm^3 and 75% of bacterial viability ($p < 0.0001$) compared to 7 and 30 days. The sulfonic / sulfuric acid compound has the ability to remove and inhibit biofilm, significantly affecting biovolume compared to other irrigants ($p < 0.001$), however, it does not have the ability to affect bacterial viability ($p > 0.05$). **Conclusion:** The sulfonic / sulfuric acid compound breaks down the biofilm, but allows the persistence of viable bacteria.

KEY WORDS: *Enterococcus faecalis*, biofilms, root canal therapy, disinfection, desiccation.

1.INTRODUCCIÓN

El objetivo del tratamiento endodóntico es la conformación, limpieza y desinfección del sistema de conductos radiculares a través de técnicas de preparación químico mecánica que permiten una desbridación de las paredes dentinales generando un espacio adecuado para la entrada y llegada de las sustancias antimicrobianas hasta el tercio apical para lograr una descontaminación y posteriormente una obturación, que permite un sellado tridimensional de estos conductos radiculares y prevenir la reinfección (Siqueira *et al.*, 2008). Se ha asociado a la intrincada, diversa y atípica morfología del sistema de conductos radiculares y su alta complejidad con presencia de istmos, deltas apicales o conductos accesorios (Versiani *et al.*, 2012, 2016, Ahmed & Hashem 2016) , lugares que son de difícil o imposible acceso, para ser tratados con los instrumentos endodónticos durante la preparación biomecánica o de los irrigantes durante el proceso de descontaminación, favoreciendo la permanencia de las bacterias en los túbulos dentinales e impidiendo su eliminación (Pérez *et al.*, 2018, Siqueira Jr *et al.*, 2018). Se ha demostrado en la microbiota recuperada de dientes con tratamiento endodóntico fallido o con infecciones refractarias es predominantemente bacterias Gram positivas especialmente el *Enterococcus faecalis*, el cual juega un papel importante en la etiología de lesiones periapicales persistentes después de un tratamiento endodóntico (Distel *et al.*, 2002), a su vez la capacidad de conformar biofilm monoespecie, que le confiere una resistencia a los múltiples irrigantes utilizados en endodoncia (Endo *et al.*,2014).

Teniendo en cuenta, los desafíos presentados por el sistema de conductos radiculares, un requisito terapéutico confiable de la desinfección endodóntica es eliminar la estructura del biofilm y erradicar completamente las bacterias residentes, incluso en lugares donde la instrumentación del conducto radicular no fue posible es importante que, durante este proceso, la superficie dentinal involucrada no presente ningún cambio físico, mecánico y/o químico (Kishen.,2012). Por ello recientemente la investigación en endodoncia, se ha enfocado en buscar nuevas alternativas de sustancias irrigadoras que puedan cumplir todas cualidades del irrigante ideal, esto permitiría acortar los tiempos de tratamiento y favorecer en gran medida los pronósticos de tratamientos complejos o de difícil resolución.

El hipoclorito de sodio sigue siendo el irrigante más común y utilizado en endodoncia, por sus excelentes propiedades antimicrobianas, acción proteolítica y alta capacidad de disolución de tejido pulpar (Haapasalo *et al.*, 2010) sin embargo, a pesar de estas excelentes propiedades, se ha reportado el daño que puede causar a los tejidos periapicales y periodontales por su extrusión accidental a través del foramen apical durante la preparación químico-mecánica (Farook *et al.*, 2014), así como los cambios estructurales que puede causar en la dentina por sobreexposición (Sauro *et al.*, 2009), lo cual es un punto crítico, teniendo en cuenta la extensión promedio de un tratamiento endodóntico puede ser de una hora.

Otras sustancias han sido ingresadas a los protocolos de irrigación como el EDTA 17% y la CHX 2%, el primero porque tiene la capacidad de remoción de la capa inorgánica del smear-layer y complementa en ese aspecto al NaOCl 5.25% (Kandaswamy *et al.*, 2010), el segundo se implementa por su amplio espectro antimicrobiano (Mohammadi *et al.*, 2014) y como inhibidor de las MMPs de la dentina hasta por 6 meses (Hebling *et al.*, 2005), estudios previos han reportado el efecto adverso de los irrigantes en la dentina (Bitter *et al.*, 2013; Haragushiku *et al.*, 2015).

Por lo anterior, la investigación en endodoncia ha enfocado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas sustancias que cumplan con las características de un irrigante ideal para optimizar los protocolos de irrigación actual o porque no, reducirlos. Recientemente un compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico se introdujo al mercado, como un producto indicado para la remoción de smear-layer y biofilm, aún no tiene reportes de si presenta eventos adversos sobre la superficie dentinal ni sobre su capacidad de remoción de smear-layer post instrumentación como es su indicación. Ye *et al.*, 2018, reportaron que este compuesto no fue efectivo en la disrupción de biofilm de *E. faecalis*, comparado con el NaOCl 6%. Ante la falta de reportes sobre la acción de este compuesto a nivel endodóntico, el objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de un compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico con irrigantes antimicrobianos usados durante el tratamiento convencional sobre un modelo de biofilm endodóntico *in vitro* de *E. faecalis*, para lo cual se logró estandarizar un modelo de biofilm, endodóntico monoespecie con *E. faecalis* de 14 días de evolución sin recambio nutrientes y se evaluó la eficacia del compuesto junto con los irrigantes convencionales en eliminación e inhibición del biofilm.

En este estudio se demostró que el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico tiene una alta capacidad de disgregación de biofilm, pero no afecta significativamente la viabilidad bacteriana, permitiendo que persistan bacterias viables. Adicionalmente, en las imágenes de la microscopia electrónica de barrido (FE-SEM) se reveló que este producto causa un daño estructural severo en la dentina. Por otra parte, el NaOCl 5.25%, erradica el biofilm afectando por completo el biovolumen y la viabilidad bacteriana e inhibe la agregación bacteriana. La CHX 2% inhibe significativamente la formación de biofilm afectando considerablemente el biovolumen y la viabilidad bacteriana, por lo contrario, el EDTA17% no erradica, ni inhibe la formación de biofilm.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Infecciones Endodónticas

El éxito del tratamiento endodóntico depende de la eliminación de las bacterias existentes dentro del sistema de conductos radiculares y prevenir la reinfección, normalmente la tasa de éxito de la terapia de conductos radiculares bajo condiciones asépticas está en un rango de 70 al 95% (Siqueira *et al.*, 2008). Las infecciones microbianas en los conductos radiculares o infecciones endodónticas, son la causa primaria de periodontitis apical, patología periapical caracterizada por la inflamación y destrucción de los tejidos perirradiculares como resultado de la interacción entre los factores microbianos y la respuesta inmune del hospedador (Nair., 2004). Las infecciones endodónticas que dependen de su localización anatómica han sido clasificadas como intraradiculares y extraradiculares, las infecciones endodónticas intraradiculares se dividen en primaria, secundaria o persistente, el cual se determina de acuerdo al tiempo de ingreso al conducto radicular. Las infecciones endodónticas primarias se generan en conductos radiculares no tratados donde los microorganismos acceden y colonizan el tejido pulpar afectando su función, se caracterizan por ser polimicrobianas, dominadas por bacterias anaerobias (Siqueira *et al.*, 2009). Las infecciones endodónticas secundarias o persistentes, se asocian con periodontitis apical posterior al tratamiento endodóntico, dando lugar a un fracaso del tratamiento. En este caso, los microorganismos pueden haber tolerado los procedimientos químico-mecánicos (infección persistente) o haber invadido el conducto radicular a través de microfiltraciones presentes en restauraciones coronales desadaptadas o fracturadas (infección secundaria) (Gomes *et al.*, 2004, Siqueira *et al.*, 2005a, Siqueira *et al.*, 2009). La microbiota encontrada en casos de fracaso endodóntico está compuesta por un grupo de especies más restringido en comparación con las infecciones primarias (Siqueira *et al.*, 2009). Métodos tradicionales de identificación microbiana como cultivos bacterianos y estudios moleculares en infecciones endodónticas, han confirmado la presencia de *Enterococcus faecalis* como una de las bacterias más frecuentes encontradas en conductos radiculares después de retratamientos y asociada con infecciones endodónticas persistentes o secundarias (Segdley *et al.*, 2006).

2.1.2 *Enterococcus faecalis*, características de crecimiento y supervivencia

El *E. faecalis* es un coco Gram positivo anaerobio facultativo que puede estar solo, en pareja o en cadenas cortas. Es considerado comensal de la microbiota gastrointestinal y normalmente no causa daño al hospedador, está asociado a infecciones oportunistas del tracto urinario, sobreinfección de heridas, bacteriemia y endocarditis. Tiene capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno, sobrevive en condiciones hostiles como condiciones de pH alcalino (pH 9.6- 11.5) o de alta salinidad (6.5% NaCl), escasas de nutrientes por periodos prolongados de tiempo (Koch *et al.*, 2004; Pillar *et al.*, 2004).

E. faecalis cataboliza una variedad de fuentes de compuestos orgánicos como carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina; es resistente a sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, ácidos y desecación; pueden crecer en un rango de temperatura entre 10 a 46 °C y sobrevivir a temperaturas de 60°C durante 30 minutos lo que le permite adherirse al colágeno (Stuart *et al.*,2006). Adicionalmente, ha sido asociado a infecciones de dispositivos médicos artificiales debido a su capacidad de formación de biofilm, lo cual dificulta el tratamiento ya que incrementa la resistencia antibiótica especialmente a la vancomicina (VanTyne *et al.*,2014).

2.1.3 *Enterococcus faecalis* y colonización de conductos radiculares

La alteración estructural de las barreras físicas a nivel dental (esmalte, cemento y dentina) a través de caries, fisuras, fracturas facilitan el acceso al tejido pulpar e ingreso de bacterias al sistema del conducto radicular (Gomes *et al.*, 2014). Ante estos hallazgos, se ha propuesto que *E. faecalis* ingresa al sistema de conductos radiculares por microfiltración en restauraciones desadaptadas o exposición pulpar directa en casos donde el aislamiento con tela de caucho falla, colonizando los túbulos dentinales y conformando biofilm monoespecie el cual lo protege de la preparación químico–mecánica, ya que puede sobrevivir en medios con restricción nutricional por periodos prolongados de tiempo y cuando se restituye de alguna forma la adquisición nutricional, tiene la oportunidad de resurgir desde los túbulos dentinales convirtiéndose en una fuente de reinfección (Siqueira *et al.*, 2008; Sedgley *et al.*, 2006; Sedgley *et al.*, 2005).

A nivel oral *E. faecalis*, ha sido detectado en infecciones endodónticas refractarias con una prevalencia de 24-70% por cultivo y en porcentajes más altos de 67-77% cuando la detección fue por PCR (Stuart *et al.*,2006; Siqueira *et al.*, 2004).

2.1.4. *Enterococcus* y conformación de biofilm endodóntico monoespecie

Se han planteado varias teorías sobre el desarrollo del biofilm intraconducto de *E. faecalis* que involucra tres etapas: 1. Formación de microcolonias adheridas a la superficie dentinal del conducto radicular, 2. disolución del componente mineral de la dentina que permite un incremento de iones calcio y fosfato, 3. mineralización del biofilm, debido a la interacción de bacterias y sus productos metabólicos en la dentina (Jhajharia *et al.*, 2015).

Los biofilm, son comunidades microbianas unidas a una superficie que están embebidas en una sustancia extracelular polimérica. La característica de formación de biofilm les confiere a algunas especies bacterianas ventajas significativas de supervivencia que no es visto en su forma planctónica.

Estas ventajas incluyen un hábitat más amplio para crecer e incrementar la resistencia al estrés ambiental, son 1.000 veces más resistentes a la fagocitosis, agentes antimicrobianos, acción de anticuerpos, antibióticos y más efectivas en evadir el sistema inmunológico del hospedador (Stewart *et al.*, 2002; Fux *et al.*, 2005; Tay *et al.*, 2015). Esta conformación le ha contribuido al *E. faecalis* una resistencia a diferentes sustancias antimicrobianas utilizadas en endodoncia para descontaminación del sistema de conductos radiculares y a medicamentos intraconducto (Kayaoglu *et al.*, 2004), lo que ha centrado la investigación en la búsqueda de nuevas sustancias irrigadoras que tengan la capacidad de disgregar este biofilm y tener a su vez un efecto antimicrobiano, para así garantizar una adecuada descontaminación y prevenir una reinfección.

2.2 Irrigantes en endodoncia

El objetivo del tratamiento endodóntico es eliminar las bacterias de los conductos radiculares infectados previniendo la reinfección, a través de la limpieza, conformación, irrigación del conducto disminuyendo significativamente el número de bacterias allí presentes, pero obtener una completa desinfección es imposible en todos los casos (Sedgley *et al.*, 2006). La inhabilidad de alcanzar la porción apical con los instrumentos endodónticos tiene un impacto negativo significativo en el pronóstico del tratamiento. Durante la instrumentación biomecánica se produce smear-layer, el cual se compone de material orgánico e inorgánico de la dentina, así como de restos de tejido pulpar (vital o necrótico), estos depósitos pueden ofrecer protección a los biofilm que ya están adheridos a las paredes dentinales, así mismo interfiere con la interfaz de unión entre los cementos selladores y las paredes dentinales generando microfiltraciones (Kokkas *et al.*, 2004).

Históricamente se han implementado varias soluciones acuosas como irrigantes endodónticos, entre ellos, el cloruro de sodio o el formaldehído, los cuales eran altamente tóxicos y alergénicos. El irrigante ideal en endodoncia se ha sugerido, debe tener un amplio espectro antimicrobiano, ser altamente eficaz contra microorganismos aerobios facultativos organizados en biofilm, disolver o degradar restos de tejido pulpar vital y necrótico, inactivar endotoxinas, prevenir la formación del smear-layer durante la instrumentación o disolverlo una vez este se ha formado, no causar toxicidad sistémica, no ser cáustico al estar en contacto con los tejidos periodontales y tener poca reacción anafiláctica (Zehnder *et al.*, 2006).

2.2.1 Hipoclorito de sodio

El cloro es uno de los elementos ampliamente distribuido en la tierra, este no se encuentra en estado libre en la naturaleza, pero sí en combinación con sodio, potasio, calcio y magnesio. En el cuerpo humano el cloro se puede generar por los neutrófilos por la vía de la mieloperoxidasa mediante clorinación de un compuesto nitrogenado o de un conjunto de compuestos (Zehnder *et al.*, 2006). Aproximadamente en 1920, el hipoclorito de sodio (NaOCl) comenzó a ser utilizado en endodoncia como el principal irrigante ya que era económico, de fácil disponibilidad y buena preservación.

La controversia en la utilización del NaOCl se basa en la concentración en que debe utilizarse, estudios *in vitro* han reportado que su capacidad antimicrobiana contra *E. faecalis* y de disolución de tejido pulpar es dependiente de la concentración, a mayor concentración aumenta la efectividad de este irrigante para ambas condiciones, pero también aumenta su toxicidad (Ma *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012) por lo cual actualmente se maneja a 5.25%. Sin embargo, se han reportado irritaciones severas o destrucción tisular cuando se ha presentado extrusión accidental al periápice durante la irrigación o filtración a través de la tela de caucho (Bramante *et al.*, 2015), así como una reducción significativa en el módulo de elasticidad y la fuerza flexural de la dentina por la acción proteolítica sobre la matriz de colágeno de la dentina (Marshall *et al.*, 2001; Sauro *et al.*, 2009).

El cloro reactivo en solución acuosa a temperatura corporal puede tomar dos estados: Hipoclorito (OCl^-) o ácido hipocloroso (HOCl). La concentración de estas sustancias puede ser expresada como la disponibilidad de cloro en cada una, por lo que 1 mol de hipoclorito contiene 1 mol de cloro disponible. Esta cantidad de cloro disponible depende del pH de la solución, a un pH mayor a 7.6 predominará la forma OCl^- , por debajo de ese valor se obtiene HOCl . En ambas formas, el cloro es muy oxidante y reactivo.

Las soluciones puras de hipoclorito utilizadas en endodoncia tienen un pH de 12, por lo tanto, el cloro disponible está en forma de OCl^- . Sin embargo, se ha reportado que el ácido hipocloroso tiene mejores efectos bactericidas que el hipoclorito (Zehnder *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta estas características, el hipoclorito de sodio sigue siendo el irrigante más recomendado durante la realización de un tratamiento endodóntico, ya que se ha reportado su gran eficacia antimicrobiana y alta capacidad de disolución de tejido pulpar vital o necrótico (Naenni *et al.*, 2004; Haapasalo *et al.* 2010).

2.2.2 Clorhexidina

Por otra parte, dentro de la línea de irrigantes, surge el gluconato de clorhexidina (CHX), una sustancia antiséptica potente de la familia de las bisguanidinas. Es una base fuerte y es más estable en forma de sales. Las sales originales fueron el acetato de clorhexidina y el hidrócloro, ambos, poco solubles en agua y fueron reemplazados posteriormente por el gluconato de clorhexidina (CHX) (Zehnder *et al.*, 2006). Es un potente antiséptico, ampliamente utilizado para el control de placa en la cavidad oral (Addy *et al.*, 2000). Las soluciones acuosas para el control de placas son de 0.1- 0.2%, mientras que la concentración para uso endodóntico es al 2%, la solución acuosa es más estable a pH 5-8, por lo general la clorhexidina es menos cáustica que el hipoclorito, pero a concentración al 2% es irritante para la piel (Zamany *et al.*, 2003).

La CHX es usada en endodoncia como una sustancia irrigadora final por su amplio espectro de acción antimicrobiana, sustentividad y baja toxicidad, sin embargo, la incapacidad de la CHX de disolución de tejido vital o necrótico ha sido señalada como su principal desventaja (Akisue *et al.*, 2010).

El efecto de la sustentividad consiste en que las moléculas de CHX son absorbidas por las moléculas de carga negativa de la dentina específicamente la hidroxiapatita, permitiendo que se mantenga y prolongue la actividad antimicrobiana por varias horas. El efecto bactericida de la CHX se debe a que su molécula catiónica se une a las paredes bacterianas que están cargadas negativamente alterando así el equilibrio osmótico de las mismas (Gomes *et al.*, 2013), aumentando drásticamente la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, esto provoca la precipitación de citoplasma y la muerte celular debido a la lisis de la célula bacteriana (Fiorillo., 2019). Su efecto se ha demostrado en bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos particularmente *Candida albicans* (Gomes *et al.*, 2013). Así mismo, se ha demostrado que la CHX es efectiva disminuyendo la viabilidad bacteriana en biofilms de *E. faecalis*, sin embargo, no se ha evidenciado un efecto importante en la disgregación del mismo (Mohammadi *et al.*, 2009).

Se ha reportado que la CHX tiene la capacidad de preservar la capa híbrida y la fuerza de adhesión *in vitro* e *in vivo*, por su efectividad como inhibidor de metaloproteinasas (MMPs) presentes en la dentina, lo anterior implica, una degradación más baja de la capa híbrida y de las fibras colágenas de la capa sub-híbrida. Esta es una propiedad importante de la CHX, debido a que una de las razones es la pérdida de integridad en la unión resina-dentina con el tiempo, es la degradación de las fibras colágenas expuestas en las capas híbridas. Esta degradación es atribuida a un mecanismo proteolítico endógeno que involucra a las MMPs presentes en la dentina (Gomes *et al.*, 2013).

A nivel práctico la CHX tiene una gran limitación al ser utilizada como irrigante complementario, porque cuando interactúa con el NaOCl estas dos sustancias presentan una reacción cruzada y forman un precipitado denominado paracloroanilina (PCA). En este caso la CHX se hidroliza lentamente por sustitución del grupo guanidina en su molécula, generando una reacción ácido-base, ya que la CHX es un ácido dicarboxílico (pH 5.5-6.0) por lo cual tiene la habilidad de donar protones y el NaOCl es alcalino (pH 12) y puede aceptar protones, este intercambio de protones resulta en la formación de esta sustancia insoluble y neutral de difícil remoción del tejido dental (Basrani *et al.*, 2007), que genera una pigmentación coronal severa.

2.2.3 Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)

El EDTA es un agente quelante que puede disolver las partículas inorgánicas de la dentina reaccionando con los iones de calcio y formando un complejo quelato soluble de calcio, que tiene alta efectividad en remover el smear-layer generado por la acción de las limas durante la preparación biomecánica.

El EDTA es una solución neutral o ligeramente alcalina que a un pH ácido se precipita, generalmente se usa a una concentración en solución de 15% o 17%, sin embargo, tiene una baja capacidad antiséptica, ya que puede debilitar la membrana celular bacteriana, pero no puede inducir lisis celular, puede funcionar de manera sinérgica con otras sustancias como la clorhexidina, que actúa mejor sobre la pared celular bacteriana (Stojicic *et al.*, 2012).

A nivel clínico, se debe evitar el contacto entre el EDTA con NaOCl, ya que inmediatamente reduce el cloro disponible del hipoclorito convirtiéndolo en un irrigante ineficaz ante las bacterias, por lo cual se recomienda un lavado con una sustancia neutra entre los dos irrigantes (Zehnder *et al.*, 2005), si se utiliza el EDTA como irrigante final, no debe utilizarse nuevamente NaOCl, ya que causa erosión en la dentina (Qian *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta, estos aspectos generales de las diferentes sustancias irrigadoras utilizadas en endodoncia, se puede determinar que estas independientemente no logran erradicar de manera eficiente los diferentes microorganismos principalmente el *E. faecalis*, que logran permanecer dentro del sistema de conductos radiculares después de una preparación químico-mecánica, por ello actualmente se manejan diferentes protocolos de irrigación para potencializar y complementar entre si estas sustancias, como una herramienta que permita cumplir con el principal objetivo de la irrigación. Por ello, de manera simultánea se siguen buscando múltiples sustancias o compuestos alternativos, con otros mecanismos de acción que nos permitan en un futuro, encontrar ese irrigante que cumpla con todas las características ideales. Dentro de estas nuevas alternativas se encuentra el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico.

2.2.4 Compuesto ácido sulfónico/sulfúrico

El compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico, es un nuevo producto desarrollado por laboratorios EPIEN Medical, Inc., indicado como irrigante de sistemas de conductos radiculares para remover smear-layer post-instrumentación y en ficha técnica del producto, también remueve biofilm. Es considerado un potente desecante de contacto líquido, el cual su mecanismo de acción es descrito como “Desiccation Shock Debridement Technology (DSD), debido a que contiene una mezcla concentrada de ácido sulfónico /sulfúrico que tienen fuerte afinidad por el agua (EPIEN medical., 2015).

Este compuesto es una mezcla acuosa concentrada de ácido hidroxibenceno sulfónico (37%), ácido hidroximetoxibenceno sulfónico (23%), ácido sulfúrico (28%), agua (12%), FD & C Red # 40 (Gel contiene: sílice coloidal). Está diseñado para ser usado en su estado semi-viscoso original o diluido con agua, y/o combinado con otro producto hará que el producto sea ineficaz y potencialmente dañino.

Debido a su estructura química, el compuesto puede desnaturalizar las proteínas que utilizan las bacterias para unirse a la matriz del biofilm, a través de una potente acción desecante (secado tópico) (EPIEN medical., 2015). La desecación del biofilm es consecuencia de la rápida sustracción del agua de la matriz producida por los ácidos sulfónico y sulfúrico. Sobre la base del alto contenido de agua que presenta el biofilm, se puede esperar que éstos pierdan su integridad una vez se encuentren expuestos a la acción tópica de un agente con propiedades higroscópicas. Esto permite una mejor eliminación de los microorganismos presentes en el biofilm (EPIEN medical., 2015).

El grupo sulfato tiene una polaridad con los átomos de oxígeno en su superficie exterior que le da una carga superficial negativa fuerte, la molécula de agua también tiene una estructura con una polaridad que le da una carga negativa en un lado y una carga positiva en el otro. El grupo sulfato para estabilizarse con el agua atrae a su carga negativa y muchas cargas positivas de moléculas de agua, las cuales se unen de forma reversible a la molécula de sulfato a través de una interacción electrostática conocida como enlace de hidrógeno, donde la carga positiva en la superficie de los átomos de hidrógeno de la molécula de agua es atraída por la carga negativa de la superficie de átomos de oxígeno en el sulfato. Los grupos sulfato realmente compiten para unir las moléculas de agua disponible con otros tipos de grupos moleculares polares en su vecindad manteniendo un enlace de hidrógeno más fuerte, figura 1 (EPIEN medical., 2015). El ácido sulfúrico altamente concentrado tiene una cantidad mínima de agua unida a ella, por lo cual tiene una afinidad neta por el agua tan fuerte que hará sus propias nuevas moléculas de agua, atrayendo grupos hidroxilo y átomos de hidrógeno de moléculas cercanas combinándolos en su superficie a través de un proceso químico denominado reacción de deshidratación (EPIEN medical., 2015).

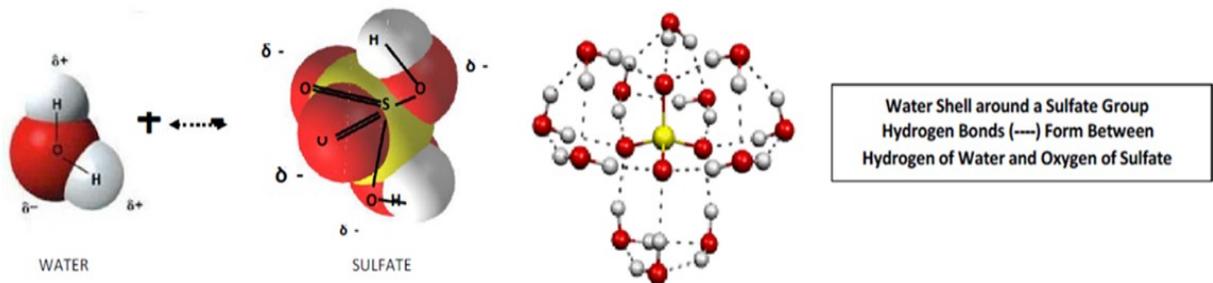


Figura 1. Mecanismo de acción del compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico. Interacción de la molécula de agua el grupo sulfato, formando puentes de hidrógeno, principio del DSD (Desiccation Shock Debridement) – Desbridamiento por choque de desecación. Tomado de: EPIEN medical., 2015.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La principal etiología relacionada del fracaso de los tratamientos endodónticos, es la persistencia de microorganismos en el sistema de conductos radiculares, que son resistentes a los procedimientos de desinfección durante la preparación químico-mecánica o por re-contaminación cuando estos ingresan al sistema de conductos radiculares durante o después del tratamiento endodóntico. Se ha asociado el fracaso endodóntico con la morfología atípica del sistema de conductos radiculares caracterizado por la presencia de istmos, deltas apicales o conductos accesorios, los cuales generan limitantes técnicas durante la realización de los tratamientos. En este intrincado sistema, hay espacios de imposible acceso que no logran ser tratados con los instrumentos endodónticos convencionales ni por los irrigantes durante la preparación químico-mecánica, quedando amplias áreas en las paredes dentinales sin instrumentar y descontaminar favoreciendo la permanencia de las bacterias en los túbulos dentinales e impidiendo su eliminación (Siqueira *et al.*, 2008).

Los métodos tradicionales de identificación microbiana como cultivos bacterianos y estudios moleculares en infecciones endodónticas, han confirmado la presencia de *E. faecalis* como una de las bacterias más frecuente encontradas en conductos radiculares después de retratamientos y asociada con infecciones endodónticas persistentes o secundarias (Sedgley *et al.*, 2006; Endo *et al.*, 2014). Se ha reportado que el *E. faecalis* tiene la habilidad de invadir los túbulos dentinales, además de una alta capacidad de colonización y formación de biofilm monoespecie en conductos radiculares humanos, lo cual le permite sobrevivir en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes y crecer de manera rápida cuando la fuente de nutrientes es restablecida (Distel *et al.*, 2002). Comparado con bacterias plantónicas, las bacterias en biofilm son 1.000 veces más resistentes a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos, a su vez las bacterias poseen factores de virulencia les permite adherencia, colonización, resistencia, patogenicidad y evasión de la respuesta inmune del hospedero además de contribuir potencialmente a la formación de biofilm (George *et al.*, 2005). *E. faecalis* depende de sus factores de virulencia para generar patogenicidad, y los utiliza para mejorar su capacidad de supervivencia y persistencia en los conductos radiculares (Sedgley *et al.*, 2005). Ante la resistencia del *E. faecalis* a la preparación químico-mecánica en casos de falla endodóntica, se han realizado estudios para evaluar la eficacia de los diferentes irrigantes endodónticos como NaOCl a diferentes concentraciones, CHX al 2%, EDTA al 17% y mezclas entre estos; pero la mayoría de estudios *in vitro* han sido realizados en bacterias plantónicas, lo cual generalmente no

representa la condición encontrada en conductos infectados *in vivo*, en donde esta bacteria crece formando biofilm monoespecie en las paredes dentinales (Sedgley *et al.*,2006).

Varios autores han reportado múltiples modelos de biofilm *in vitro* con *E. faecalis*, para evaluar irrigantes endodónticos. Dunavant *et al.*,2006, desarrollaron un modelo basado en un sistema de flujo constante de nutrientes en matrices de dentina, donde evaluaron la acción dos concentraciones de NaOCl (1% y 6%), Ma *et al.*,2011, estandarizaron un modelo sobre semicilindros de dentina, induciendo el ingreso del microorganismo dentro de los túbulos dentinales con centrifugación y realizando recambio de medio con bacteria fresca entre cada centrifugación por 24 horas, evaluaron NaOCl (1%, 2% y 6%), CHX 2% y Qmix. Frough-Reihani *et al.*, 2016, desarrollaron el modelo sobre discos de dentina, evaluando la efectividad del NaOCl en diferentes concentraciones (1%, 2.5% y 5%).

Recientemente fue aprobado por la FDA y lanzado al mercado una solución considerada como un complemento para la irrigación endodóntica, indicado para remover smear-layer post-instrumentación; pero no hay reportes sobre su efectividad en remoción de smear-layer, y solo un reporte sobre viabilidad bacteriana o su efecto sobre biofilms endodónticos monoespecie con *E. faecalis* (Ye *et al.*, 2018). Por todo lo anterior, es necesario la creación de un modelo de biofilm endodóntico con *E. faecalis in vitro* que represente o se ajuste a las condiciones reales de un biofilm formado en la superficie dentinal, para evaluar la actividad de estas sustancias antimicrobianas sobre la formación de un biofilm monoespecie de *E. faecalis*. A su vez con este trabajo, se busca investigar otras alternativas de sustancias antimicrobianas irrigadoras que no han sido aplicadas a nivel endodóntico como los compuestos de ácido sulfónico/sulfúrico con respecto a los irrigantes convencionales.

4. JUSTIFICACIÓN

La persistencia de infección es la principal causa de falla endodóntica. Las infecciones endodónticas primarias normalmente son polimicrobianas con una supremacía de bacterias anaerobias Gram negativas. Sin embargo, en las infecciones endodónticas secundarias, los microorganismos involucrados se limitan a una o pocas especies Gram positivas anaerobias. La especie aislada con mayor frecuencia en conductos obturados con infecciones refractarias es el *E. faecalis* (Siqueira *et al.*, 2008).

E. faecalis resiste a la preparación químico–mecánica y permanece dentro del sistema de conductos radiculares favoreciendo la infección persistente (Siqueira *et al.*, 2005). Los mecanismos de resistencia del *E. faecalis* le confieren una ventaja selectiva y se convierte en una estrategia de supervivencia ante el tratamiento con agentes antimicrobianos (Endo *et al.*, 2014).

Estudios *in vitro* han centrado su atención en la evaluación de la eficacia de irrigantes y medicamentos que permitan remover biofilms en matrices y discos de dentina y contaminados con *E. faecalis* (George *et al.*, 2005; Dunavant *et al.*, 2006). Ante la resistencia de *E. faecalis* a las diferentes sustancias irrigadoras utilizadas comúnmente en endodoncia, se ha pensado en la introducción de otros agentes que puedan complementar de manera efectiva a los irrigantes convencionales o evaluar otras propiedades que puedan dar otras alternativas terapéuticas. La FDA una sustancia, cuyo principio activo son los compuestos de ácidos sulfónicos/sulfúricos de uso tópico, no antibiótico, capaz de eliminar biofilm. Este producto contiene una tecnología patentada basada en el “shock desecante” o desecación directa, indicado para remoción de smear-layer (EPIEN medical Inc., St. Paul, MN, USA). Este agente no tiene reportes sobre su eficacia en remoción de smear-layer, a su vez solo hay un estudio donde ha sido evaluado como sustancia antimicrobiana tipo irrigante endodóntico con alguna capacidad antimicrobiana sobre biofilm de *E. faecalis* (Ye *et al.*, 2018).

Entre las dificultades que existen en el estudio de biofilm endodóntico es tratar de simular las condiciones *in vivo* dentro de los conductos radiculares que favorecen su formación en biofilm, la complejidad técnica para el análisis de los procesos internos y las consideraciones éticas asociadas con estudios *in vivo* en pacientes con fracaso endodóntico. Por ello es necesario implementar modelos de biofilm endodóntico *in vitro* con *E. faecalis* que faciliten la evaluación de la eficacia de sustancias antimicrobianas tipo irrigantes sobre bacterias en biofilm.

5. SITUACIÓN ACTUAL

5.1 Fracasos endodónticos y *E. faecalis*

La causa primaria de fracaso endodóntico es la persistencia de microorganismos dentro del sistema de conductos radiculares. Teniendo en cuenta que este sistema de conductos radiculares se caracteriza por presentar múltiples alteraciones anatómicas es muy difícil o imposible el acceso con los instrumentos, técnicas e irrigantes actuales (Siqueira *et al.*, 2008). Utilizando técnicas de cultivo y análisis de PCR revelaron la presencia de *E. faecalis*, siendo la especie más prevalente detectada en casos de retratamiento (Segdley *et al.*, 2006).

Hay fuerte evidencia que después de la preparación químico-mecánica, las células bacterianas sobrevivientes pueden permanecer en los conductos obturados por largos periodos (Distel *et al.*, 2002). *E. faecalis* tiene habilidad de crecer en forma biofilm monoespecie, ya que posee factores de virulencia que le permiten invadir y sobrevivir en los túbulos dentinales de 500-1000 μm desde el lumen del conducto, a su vez resistir a los antimicrobianos y tolerar períodos prolongados de inanición ante una restricción nutricional en conductos radiculares tratados y recuperarse cuando se restablece o existe una fuente nutricional adecuada (George *et al.*, 2005). La suposición que *E. faecalis* juega un papel importante en el fracaso del tratamiento endodóntico ha dado lugar a varios estudios *in vitro* y *ex vivo* que probaron protocolos para eliminarlo de los conductos radiculares, evaluando el efecto antimicrobiano de diferentes irrigantes endodónticos en biofilms de *E. faecalis*.

Dunavant *et al.*, 2006 utilizando un sistema de flujo, demostraron una alta efectividad del NaOCl en eliminar biofilm *E. faecalis*; el porcentaje de muerte bacteriana en biofilms después de utilizar NaOCl 6%(99.99%) y 1%(99.78%) mostró diferencias significativas en porcentaje de muerte de *E. faecalis* entre NaOCl y los otros grupos (Biopure MTAD, CHX 2%, REDTA, Smear Clear y solución salina) ($p < 0.05$). Del mismo modo Williamson *et al.*, 2009, indicaron que el NaOCl 6% fue significativamente superior contra la reducción de *E. faecalis* en biofilm comparado con CHX 2%.

Por su parte Liu *et al.*, 2010 demostraron que las bacterias en forma de biofilms eran más resistentes a la acción del NaOCl 5,25% que las células planctónicas ya que el efecto del NaOCl sobre ellas disminuyó a medida que maduraba el biofilm, así como Del Carpio-Perochena *et al.*, 2011, pudieron mostrar que la CHX 2% no puede disolver los biofilms. Adicionalmente Soares *et al.*, 2010 demostraron que el protocolo de irrigación basado en uso alternativo de NaOCl y EDTA puede ser una buena alternativa ya que promueve

la eliminación del biofilm. Así mismo, Frough-Reihani *et al.*, 2016 basado en el efecto bactericida de NaOCl al 1, 2 y 5% en biofilms de *E. faecalis* de 4-6 y 10 semanas de formación en discos de dentina, demostraron que el NaOCl al 2,5 y 5% eliminaron totalmente biofilms de *E. faecalis* de 4-6 y 10 semanas de formación.

La FDA también aprobó una solución acuosa indicada como irrigante endodóntico para remover desechos dentinales y smear-layer post-instrumentación con acción secundaria desecante basada en compuestos de ácido sulfónico/sulfúrico. Rohrer *et al.*, 2016 compararon el uso de compuestos de ácido sulfónico/sulfúrico y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en recubrimiento pulpar directo en dientes de una especie canina, encontrando a los 7, 21 y 60 días un porcentaje de 100% de vitalidad pulpar en los dientes donde se aplicó el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico y un 50%, 62.5% y 100% en los dientes donde se aplicó $\text{Ca}(\text{OH})_2$, lo que podría deducir que este compuesto tiene la capacidad de mantener la vitalidad pulpar a través del tiempo, pero aún no hay reportes en endodoncia evaluando su efectividad en remoción de smear-layer y solo un estudio evaluando efecto del compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, SilverSol/ H_2O_2 , Qmix 2 en 1 y NaOCl 6% sobre biofilm de *E. faecalis* (Ye *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta que dentro de la investigación básica en endodoncia, el tópico de los irrigantes endodónticos es un tema ampliamente desarrollado, aún se sigue en la búsqueda de nuevas alternativas de sustancias irrigadoras, que puedan complementar o potencializar la acción de las ya existentes, específicamente en la capacidad de disgregación de los biofilms de difícil acceso en los que podría estar asociado el *E. faecalis*, por lo que el establecimiento de un modelo de biofilm endodóntico *in vitro* con esta bacteria puede ser una alternativa para analizar su estructura, viabilidad celular, dinámica y conformación de este tipo de biofilm. Así como para la evaluación de nuevas sustancias antimicrobianas como irrigantes endodónticos tipo compuestos de ácidos sulfónicos/sulfúricos, los cuales hay pocos reportes de evaluación en biofilms.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Comparar la eficacia de un compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico con irrigantes antimicrobianos usados durante el tratamiento convencional sobre *E. faecalis* en un modelo de biofilm endodóntico *in vitro*.

6.2 Objetivos específicos

1. Establecer un modelo de biofilm endodóntico *in vitro* con *E. faecalis*.
2. Comparar el efecto del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico en términos de reducción de la viabilidad bacteriana en un modelo de biofilm *in vitro* de *E. faecalis* comparado con NaOCl, CHX, EDTA.
3. Comparar el efecto del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico en la inhibición de la formación de biofilm de *E. faecalis* comparado con NaOCl, CHX, EDTA en un modelo de formación de biofilm *in vitro*.

7. METODOLOGÍA

7.1 Tipo de estudio: Experimental *in vitro*

7.2 Población y muestra

Un total de 38 dientes humanos recién extraídos premolares inferiores permanentes uni-radiculares, no cariados, con formación radicular completa, sin antecedente de tratamiento endodóntico e indicación de exodoncia con fines ortodónticos, fueron extraídos y recolectados en las clínicas odontológicas Universidad El Bosque y de la práctica privada. Estos dientes son considerados desechos biológicos que no tienen ninguna utilidad para el paciente, por lo cual se solicitó a los individuos que cumplieran con los criterios de inclusión, donar estos dientes mediante la firma de un consentimiento informado aprobado por el comité institucional de ética en investigación de la Universidad El Bosque (Anexo 1).

Una vez recolectados los dientes fueron descontaminados e inactivados con NaOCl 2,5% por 30 segundos, posteriormente, los restos que aún permanecían de tejido blando adheridos a la superficie radicular fueron removidos mecánicamente con curetas de periodoncia y almacenados en Cloramina T al 0,5% w/v por un tiempo de máximo de un mes.

7.2.1 Preparación químico-mecánica de los premolares

El acceso cameral se realizó con fresas redondas estériles # 3, patentización con lima K # 10 Flexofile (Dentsplay Maillefer), conductometría con localizador apical Root ZX II (J. Morita) a 0.5 mm del ápice, preparación biomecánica con limas Protaper Next (Dentsplay Maillefer, Ballaigues, Switzerland), lima apical principal X3, estas limas se utilizaron a 300 rpm con un torque 2 Ncm con un motor endodóntico (X-Smart, Dentsply Maillefer, Konstanz, Switzerland), protocolo de irrigación NaOCl 5,25% y EDTA 17%, irrigación final con 5mL de solución salina estéril, utilizando agujas monojet calibre 27 a 1 mm de la longitud de trabajo, secado con puntas de papel estériles.

Los dientes fueron decoronados por debajo de la unión amelo-cementaria obteniendo 38 raíces de 15 mm de longitud, posteriormente siguiendo el eje longitudinal de la raíz fueron seccionados por la mitad obteniendo semi-raíces, las cuales fueron seccionadas de nuevo por la mitad generando cuatro partes

iguales de una sola raíz para un total de 152 cuartos de raíz, los cortes fueron realizados con micrótopo (Buehler® IsoMet® 1000 Precision Cutter) con un disco de diamante de 0.3 mm de espesor (Buehler® IsoMet® Diamond Wafering Blades), (figura 2).

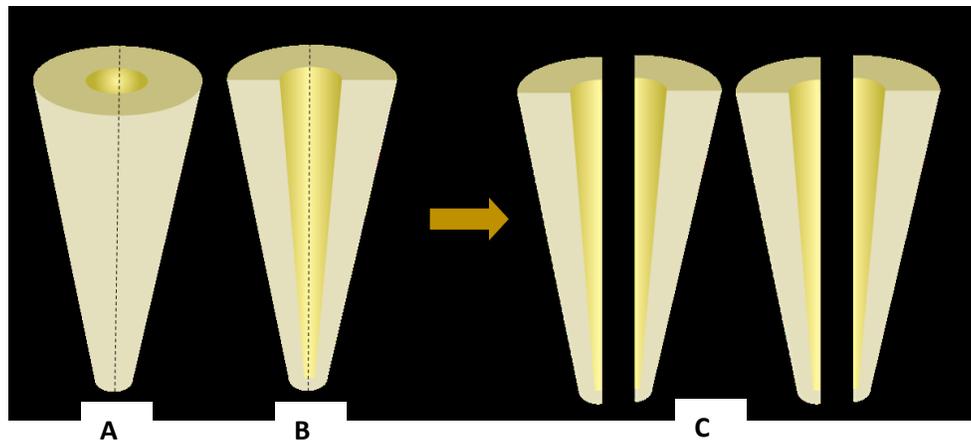


Figura 2. Esquema de corte para obtención de $\frac{1}{4}$ de raíces. Corte eje longitudinal obteniendo semirraíces (A y B), Corte longitudinal en cada semirraíz obteniendo cuatro cuartos de raíz de una raíz (C). Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña. Ilustraciones realizadas por la diseñadora gráfica Sara Mahecha Nieto.

Todos los especímenes fueron sometidos a un protocolo de sonicación con etanol al 95% durante 5 minutos a una amplitud de 40%, pulso ON: 30 seg; pulso OFF: 15 seg, con el fin de eliminar microorganismos que pudieran estar adheridos a la dentina, después fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121°C a 15 libras de presión.

7.3. Condiciones de cultivo de *E. faecalis*

E. faecalis ATCC 29212 fue descongelada del cepario congelado a -80°C del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral) y cultivada en condiciones aerobias a 37°C en placas de agar BHI (Brain Heart Infusion, BBL®). Se verificó la pureza de los cultivos en placa y se ajustaron condiciones de crecimiento bacteriano en caldo BHI, a 30 mL de caldo se le adicionaron aproximadamente 9 unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *E. faecalis* de un cultivo inicial de 18 horas de crecimiento a 37°C en condiciones aerobias. Los inóculos se dejaron en agitación a 150 rpm a 37°C entre 3 y 4 horas, se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda (λ) de 580 nm hasta obtener una densidad óptica

(DO) entre 0.790 – 0.820 con el fin de obtener 1×10^8 unidades formadora de colonias por mililitro (UFC/mL). 100 μ L del inóculo previamente ajustado, fueron utilizados para hacer diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución -8 en caldo VMGA I, después de 24 horas de incubación a 37°C, se realizó el recuento del número de bacterias por mL para tener como control de población y confirmar la cantidad de bacterias iniciales para los posteriores experimentos. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en experimentos independientes.

7.4 Modelo de formación de biofilm

El modelo de formación de biofilm monoespecie endodóntico, fue estandarizado en el marco de este estudio y dentro de la línea de investigación en Microbiología endodóntica del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO, siguiendo algunos principios descritos por Fan *et al*, (2014) con modificaciones.

Cuartos de raíces estériles previamente preparados, fueron empleados para la formación del biofilm monoespecie con inóculos ajustados para cada experimento a una concentración bacteriana de 1×10^8 bacterias/mL. 1 mL de inóculo de *E. faecalis* ATCC 29212 fue adicionado a tubos de fondo semi-cónico de 2mL que contenían $\frac{1}{4}$ de diente, se acomodaron de manera horizontal con la luz del conducto radicular en contacto íntimo con la pared del tubo. Estos tubos con bacteria y diente fueron colocados en un soporte acrílico, diseñado para garantizar la estabilidad de estos, posteriormente fueron incubados durante 7, 14 y 30 días en experimentos independientes a 37°C en condiciones aeróbicas y sin recambio de medio durante los tiempos de incubación, ni agitación con el fin de simular las condiciones de inanición y restricción nutricional que este microorganismo puede enfrentar dentro de un conducto radicular en condiciones reales. Para cada uno de los tiempos evaluados se adicionó un control negativo con consistió en 1 mL caldo BHI estéril en un tubo de fondo semi-cónico de 2 mL que contenían $\frac{1}{4}$ de diente.

Transcurrido el tiempo de incubación de cada experimento, se verificó crecimiento bacteriano en biofilm, por disgregación mecánica del mismo por pipeteo, diluciones seriadas y plaqueo en agar BHI. La formación, estructura y conformación del biofilm mediante microscopía electrónica de barrido (FE-SEM), la viabilidad bacteriana y biovolumen del biofilm se determinó mediante microscopía láser confocal (CLMS). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en experimentos independientes, para cada evaluación se

contó con un cuarto de raíz bajo las mismas condiciones de experimentación y para cada tiempo de evaluación.

7.4.1 Verificación de la viabilidad bacteriana después de la formación del biofilm por cultivo

Después de cada tiempo de evaluación, cada cuarto de raíz seleccionado para recuento bacteriano, se le retiró el medio de cultivo donde estaba formándose el biofilm, se le realizó un lavado con 1mL de agua destilada desionizada estéril para remover células bacterianas no adherentes y se adiciono 900 μ L de caldo de dilución, realizando disgregación mecánica por pipeteo fuerte sobre el conducto radicular para desprender células bacterianas que se lograron adherir a la dentina, posteriormente 100 μ L fueron utilizados para hacer diluciones seriadas en base 10 y se realizó el recuento del número de bacterias por mL. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y se calculó el promedio y desviación estándar de UFC/mL después de la formación de biofilm en los diferentes tiempos de formación.

7.4.2 Evaluación del biofilm por Microscopía

7.4.2.2 Microscopía Electrónica de Barrido con pistola de emisión de campo (FE-SEM)

Posterior a los tiempos de incubación, a cada cuarto de raíz se le retiró de manera cuidadosa el medio de cultivo, se realizó un lavado con 1mL de agua destilada desionizada estéril, para remover células bacterianas no adherentes e inmediatamente se realizó fijación con glutaraldehído tamponado al 2.5% durante 24 horas. Después de ese tiempo, se retiró el glutaraldehído y se realizó un lavado con 1mL de PBS (Buffer fosfato salino) 1X pH 7.4 e inmediatamente a cada cuarto de raíz, se les realizó deshidratación seriada con etanol a concentración ascendente iniciando al 70% durante 5 minutos, seguido de 95% 10 minutos y finalizando con 100% durante 20 minutos, luego cada cuarto de raíz identificado en sus tubos respectivos, fueron almacenados a 4°C hasta el momento de la evaluación. Posteriormente fueron llevados al servicio técnico contratado en el Laboratorio de Microscopía de la Universidad de los Andes, Bogotá D.C, Colombia, para secado por punto crítico y metalización con oro para posteriormente ser analizados por microscopía electrónica de barrido con pistola de emisión de campo (FEG-SEM, TESCAN, modelo LYRA 3, Brno, Czech Republic) con magnificaciones 6.000 y 12.000X, para evaluar morfología bacteriana, la presencia o ausencia de *E. faecalis* dentro de los túbulos dentinales y formación de estructuras tridimensionales con agregación bacteriana compatibles con biofilm monoespecie.

7.4.2.3 Microscopía láser confocal (CLMS)

La viabilidad bacteriana en el biofilm fue analizada con el kit de viabilidad bacteriana Live/Dead L7012 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) que contiene dos marcadores de ácidos nucleicos SYTO9 (que permite la tinción de bacterias viables) y Yoduro de Propidio (que tiñe las bacterias no viables) (YP).

Se estandarizaron las condiciones ideales de captura de imágenes, para lo cual se realizaron varias pruebas de ajuste en la concentración de los fluorocromos, evaluando diferentes diluciones del kit con una mezcla en parte iguales de bacterias viables y no viables; además se eliminó el ruido de fondo por autofluorescencia de la dentina con el kit de viabilidad, de esta manera se garantizó que los datos obtenidos corresponden únicamente a la fluorescencia emitida por el biofilm bacteriano, más no por de material de soporte de este.

Inicialmente se verificó la tinción de bacterias viables haciendo diluciones 1:2000 de SYTO 9 y 1:2000 con yoduro de propidio de manera independiente, con esto se confirmó que las bacterias viables realmente estaban adquiriendo la tinción adecuadamente y que no se observa ninguna señal con yoduro de propidio. Del mismo modo se evaluaron las bacterias no viables para confirmar, tinción con yoduro de propidio y ausencia de la señal con SYTO 9.

La eliminación del ruido de fondo se realizó un control de fluorescencia de la dentina, para ello se tomó un cuarto de raíz estéril sin formación de biofilm, teñido en una dilución 1:2000 del kit de viabilidad durante 2 minutos y se eliminó esta fluorescencia para SYTO 9 y para yoduro de propidio en el equipo de captura de imagen.

Una vez estabilizados todos los parámetros con las diferentes pruebas, se fijaron los siguientes parámetros de ajuste del microscopio que para todas las imágenes fueron: longitud de onda de excitación y emisión para SYTO 9: 480/530 nm; yoduro de propidio: 559/630 nm respectivamente, las imágenes se tomaron a profundidad de 30µm para garantizar un volumen, con intervalos de 1µm y 30 cortes/escaneo, a una magnificación 40X con una resolución de 1024 × 1024 píxeles.

Los especímenes con formación de biofilm, cada cuarto de raíz se le retiró de manera cuidadosa el medio de cultivo, se realizó un lavado con 1mL de agua destilada desionizada estéril, para remover células bacterianas no adherentes inmediatamente se realizó la tinción en una dilución 1:2000 con el kit de viabilidad durante 2 minutos como se estandarizo previamente. Posteriormente, se realizó un lavado con 1mL PBS 1X durante 1 minuto. Cada cuarto de raíz fue colocado sobre una laminilla cubreobjetos y analizados en el microscopio láser confocal (CLMS, Fluoview FV1000-MPE (Olympus Europa Holding

GmbH, Hamburg, Germany) de la Universidad de los Andes, Bogotá D.C, Colombia, como se estandarizó previamente. Durante la fase de estandarización se tomaron 3 imágenes de tres áreas aleatorias de cada tercio radicular (tercio cervical, tercio medio y tercio apical), donde se pudieran identificar muy bien los túbulos dentinales al borde del conducto radicular, donde se realizó la preparación biomecánica y las bacterias estuvieron en contacto.

La relación de volumen de fluorescencia verde y roja indicaba la proporción de células viables y no viables, para realizar la reconstrucción tridimensional y calcular biovolumen, se utilizó el software Imaris 8.0 (Bitplane Inc., Saint Paul, MN, EE. UU.).

Estos datos permitieron concluir que este modelo de biofilm se estableció mejor a los 14 días de formación y adicionalmente, que el tercio de análisis por microscopía debía ser tercio medio radicular, ya que presentó una cantidad de bacterias viables y biovolumen adecuado con características estructurales apropiadas, para poder desarrollar la parte de evaluación con los irrigantes endodónticos.

7.5 Evaluación de la eficacia de los irrigantes sobre biofilm monoespecie con *E. faecalis*

Una vez estandarizada la formación del biofilm, se evaluó la eliminación de este por efecto de los irrigantes (compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico, los irrigantes convenciones como: NaOCl 5,25%, CHX 2%, EDTA 17% y un control negativo con agua) y la capacidad que tienen en la inhibición de la formación del biofilm.

7.5.1 Evaluación de la eficacia de los irrigantes en la eliminación del biofilm

Para evaluar el efecto antimicrobiano y su efecto sobre la eliminación biofilm, se utilizó compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico, NaOCl 5,25%, CHX 2%, EDTA 17% y como se encuentra disponible comercialmente. Los biofilm formados de sobre los cuartos de raíz se les retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado cuidadoso con 1mL de agua destilada desionizada estéril, en su lugar se colocó 1mL de cada uno de los irrigantes durante 1 minuto. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiraron los irrigantes y se realizó un lavado final con 1mL de agua destilada desionizada estéril para inactivar y eliminar trazas de los irrigantes sobre la dentina, posteriormente cada uno de los biofilm tratados, fueron sometidos a los protocolos de preparación de muestra anteriormente descrito para ser evaluados por microscopía confocal y SEM. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y en experimentos independientes.

7.5.2 Evaluación de la eficacia de los irrigantes en la inhibición del biofilm

Con el fin de evaluar la capacidad de los irrigantes para inhibir la formación del biofilm, los cuartos de raíz fueron tratados con compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico, NaOCl 5,25%, CHX 2%, EDTA 17% y por 1 minuto, inmediatamente se realizó un lavado con 1mL de agua destilada desionizada estéril y colocados en forma vertical en tubos de 2mL estériles, adicionando 1mL de inóculo *E. faecalis* ATCC 29212 previamente ajustado a la D.O adecuada, se acomodaron de manera horizontal donde el conducto radicular quedara en contacto íntimo con la pared del tubo y se colocaron sobre el soporte acrílico incubados a 37°C en condiciones aeróbicas y sin recambio de medio durante 14 días. Después del tiempo de incubación, se les retiró el medio, se realizó lavado con 1mL de agua destilada desionizada estéril y se sometieron a los protocolos de preparación de muestra para ambas microscopias con el fin de realizar comparaciones con los biofilms sin tratamiento y determinar si los irrigantes tienen capacidad inhibitoria. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y en experimentos independientes.

7.6 HIPÓTESIS

7.6.1 Hipótesis nula (H₀)

No existen diferencias significativas en la eficacia del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico con los otros irrigantes endodónticos en la eliminación de la formación del biofilm de *E. faecalis* en un modelo de biofilm *in vitro*.

No existen diferencias significativas en la eficacia del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico con los otros irrigantes endodónticos en la inhibición de la formación del biofilm de *E. faecalis* en un modelo de biofilm *in vitro*.

7.6.2 Hipótesis alterna (H_a)

Existen diferencias significativas en la eficacia del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico con los otros irrigantes endodónticos en la eliminación de la formación del biofilm de *E. faecalis* en un modelo de biofilm *in vitro*.

Existen diferencias significativas en la eficacia del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico con los otros irrigantes endodónticos en la inhibición de la formación del biofilm de *E. faecalis* en un modelo de biofilm *in vitro*.

7.7 Plan de análisis

La formación de biofilm de 7, 14 y 30 días sobre las tres superficies radiculares (cervical, medio y apical), se analizaron los datos de biovolumen y porcentaje de viabilidad, fue evaluada realizando una prueba de normalidad Shapiro-Wilk, los cuales presentaron una distribución normal, para lo cual se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con posthoc y prueba de Tukey. Un análisis de varianza ANOVA de dos vías con posthoc y prueba de Tukey para comparar simultáneamente los días con las superficies evaluadas, para definir la mejor condición de formación de biofilm, se complementó con el análisis de datos a nivel de recuento bacteriano en los tres días de evaluación, los datos fueron transformados a logaritmo en base 10 y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con post hoc y prueba de Tukey.

La comparación del efecto de los irrigantes en eliminación e inhibición en la formación de biopelícula, se analizaron los datos viabilidad bacteriana y biovolumen, realizando un análisis de varianza ANOVA de una vía con post hoc y prueba de Tukey. Los análisis fueron realizados en el software GraphPad Prism versión 8.0 para Windows (Software Inc, La Jolla, CA, USA), todos los experimentos fueron realizados por triplicado y todos los análisis se hicieron con un nivel de significancia 5% ($p < 0.05$).

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

8.1 Sustento legal

El presente trabajo fue aprobado por el comité de ética institucional de la Universidad El Bosque. No se realizó experimentación directa en humanos, animales ni organismos genéticamente modificados, pero sí se requirió la recolección de dientes humanos para lo cual los donadores firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética institucional (Anexo 1); el riesgo de manipulación es considerado inferior al mínimo, por lo cual se acoge a las disposiciones vigentes para investigación básica *in vitro*.

Esta investigación es una experimentación en el laboratorio y se utilizaran la cepa de referencia *E. faecalis* ATCC-29212, almacenada en el cepario del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO, conservados a -80°C en caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) con 10% de glicerol. Las bacterias que se utilizaron en este estudio representan un riesgo mínimo para la salud humana.

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, resolución N° 008430 de 1993 del ministerio de salud.

9. RESULTADOS

9.1 AJUSTE DE INÓCULO

El inóculo bacteriano, se estandarizó partiendo de aproximadamente 9 UFC/mL en 30 mL de caldo BHI, después de 4 horas de incubación a 37°C en agitación a 150 rpm en condiciones aeróbicas. Se normalizó un recuento bacteriano a 1×10^8 UFC/mL, a una densidad óptica entre 0.780-0.820 con una desviación estándar de 0,04 y un coeficiente de variación de 0,01 en experimentos por triplicado.

9.2 MODELO DE FORMACIÓN DE BIOFILM

9.2.1 Recuento bacteriano

Se confirmó la viabilidad bacteriana durante la formación de biofilm a los 7, 14 y 30 días con el fin de determinar el tiempo más adecuado para su formación. Se evidenció una reducción bacteriana intraconducto desde el montaje del biofilm y continua a medida que pasa el tiempo ($p < 0.001$), (figura 3). Hubo reducción de 1 logaritmo entre la concentración bacteriana en el inóculo inicial y las bacterias que crecieron a los 7-14 días de formación de biofilm, adicionalmente, se observó una reducción de 2 logaritmos entre el inóculo inicial y 30 días de formación de biofilm. Demás de la reducción en 1 logaritmo entre 7-14 días y 30 días como se puede evidenciar en la Tabla 1.

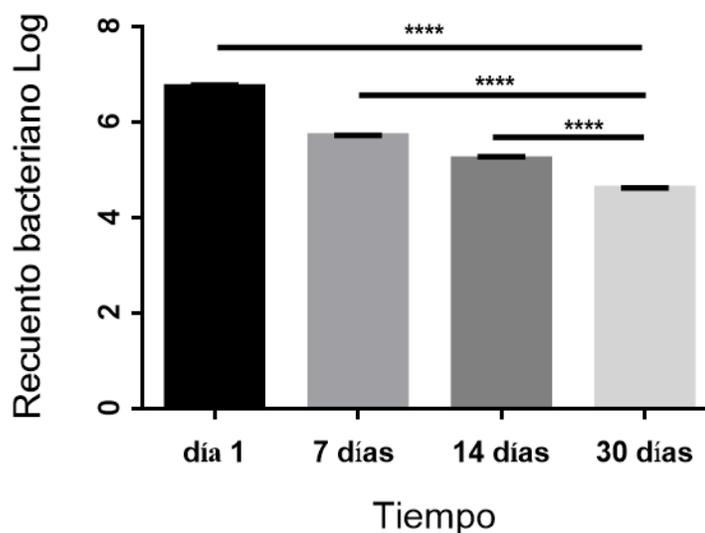


Figura 3. Recuento bacteriano en UFC-Log₁₀ de *E. faecalis* ATCC 29212 a partir del biofilm formado en diferentes tiempos de evaluación (7, 14 y 30 días). Valor de $p < 0.05$, **** ($p < 0.0001$). ANOVA y post hoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.

Tabla 1. Recuento bacteriano de *E. faecalis* ATCC 29212 expresados en UFC/mL. Tabla diseñada por la Dra. Diana Marcela Castillo y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez bajo la supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.

Condición	Promedio UFC/mL \pm DE	Coefficiente de Variación
Día 1	$5,4 \times 10^6 \pm 5,5 \times 10^5$	0,10
Biofilm 7 días	$5,1 \times 10^5 \pm 7,0 \times 10^4$	0,13
Biofilm 14 días	$1,6 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^4$	0,12
Biofilm 30 días	$4,1 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^3$	0,02

9.2.2 Análisis cualitativo de la estructura del biofilm en los tiempos de evaluación por FE-SEM.

Los resultados del FE-SEM del proceso de formación de biofilm, muestran que en este modelo, el *E. faecalis* colonizó toda la superficie dentinal correspondiente al conducto radicular, se evidencia la morfología característica del microorganismo, estructuras circulares correspondientes a cocos con un septo central, dispuestos en diplococos o cadenas, en contraste con el control sin biofilm donde se evidencia la dentina radicular con los túbulos dentinales totalmente despejados distribuidos de manera uniforme y libres de alguna morfología bacteriana (figura 4).

A los 7 días de formación de biofilm se observan cocos, distribuidos de manera aislada sobre los túbulos dentinales individualmente y/o agrupados en pareja, sin embargo no se evidencia formación de estructuras tridimensionales (figura 4 B-D), en contraste los 14 días se observan estructuras tridimensionales, con presencia de bacterias con morfología totalmente definida y algunos restos bacterianos, unidas entre sí por una estructura filamentosa con proyecciones tipo malla, que recubre la superficie de las bacterias correspondiente a una matriz, probablemente compatible con la matriz polimérica extracelular típica del inicio de una estructura de biofilm (figura 4 F-H); mientras que a los 30 días se observan conglomerados más definidos, estructuras tridimensionales con mayor agregación bacteriana, pero con múltiples espacios vacíos, gran cantidad de restos de membranas celulares y bacterias con alteraciones morfológicas importantes y poca cantidad de bacterias con morfología intacta. Se evidencia un cubrimiento considerable sobre la superficie bacteriana de estructura filamentosa, pero no se distinguen los túbulos dentinales que están totalmente cubiertos por una sustancia densa y amorfa que podrían corresponder a matriz polimérica y restos bacterianos probablemente por la pérdida de la viabilidad celular (figura 4 J-L).

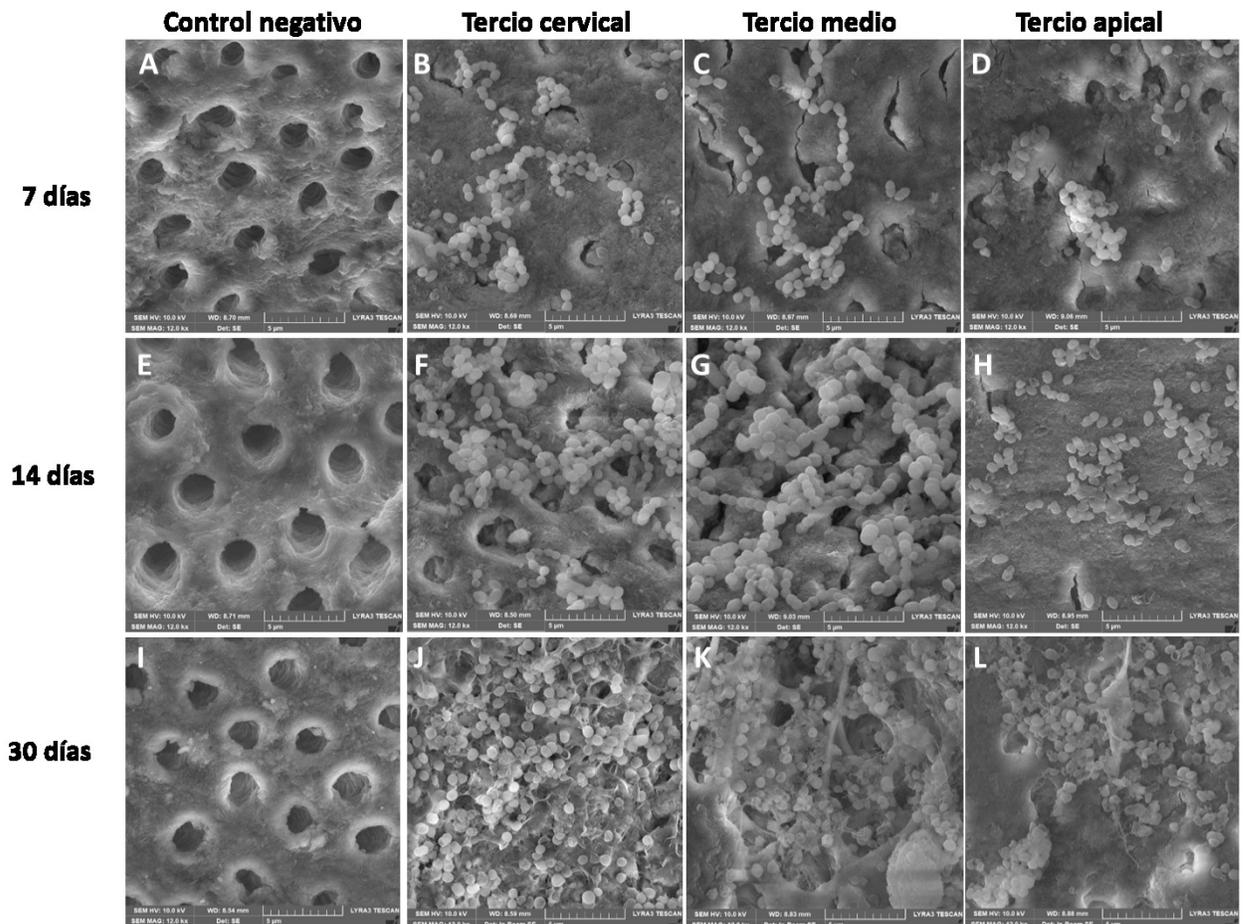


Figura 4. Imágenes de formación de biofilm con *E. faecalis* ATCC 29212. Imágenes A, E, I: Control negativo; imágenes B-D: Biofilm de 7 días de formación en las tres superficies (tercio cervical, medio y apical); imágenes F-H: Biofilm de 14 días de formación en las tres superficies, imágenes J-L: Biofilm de 30 días de formación en las tres superficies radiculares, FE-SEM 12000X. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña, captura de imágenes de microscopía electrónica de barrido del servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes.

9.2.3 Análisis de la viabilidad bacteriana y biovolumen mediante CLMS.

La viabilidad bacteriana fue evaluada por CLMS, donde las bacterias viables se pueden apreciar de color verde por la tinción de las membranas intactas con el SYTO 9 y las bacterias inviables se observan de color rojo por la tinción con yoduro de propidio debido al daño de las membranas bacterianas. Las imágenes fueron obtenidas por CLMS del biofilm formado en los tres tiempos de evaluación (7, 14 y 30 días) y las tres superficies radiculares (cervical, medio y apical). Se realizó una reconstrucción tridimensional de cada

imagen usando el software IMARIS 8.0. Se tomaron 3 imágenes aleatorias de cada superficie radicular por cada réplica (figura 5).

Teniendo en cuenta los datos de las reconstrucciones, se observa una colonización homogénea del microorganismo sobre toda la superficie radicular en cada uno de los tiempos, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las tres superficies radiculares dentro de cada tiempo de evaluación independiente ($p>0.05$) tanto en porcentaje de viabilidad como en biovolumen (figura 6).

A los 7 días se evidencia una colonización bacteriana no homogénea sobre la superficie, con presencia de zonas negras indicando ausencia bacteriana, sin embargo, entre las tres superficies el patrón de colonización es muy similar con un biovolumen promedio de $323.881 \mu\text{m}^3$ para el tercio cervical, $354.671 \mu\text{m}^3$ el tercio medio y $347.999 \mu\text{m}^3$ tercio apical sin diferencias estadísticamente significativas, predominando el color verde lo que indica mayor presencia de bacterias viables, de manera congruente con los datos de porcentaje de viabilidad 80% en tercio cervical, 82% en tercio medio y 84% en tercio apical, en la viabilidad entre superficies evaluadas tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) (figuras 5 y 6).

Por otro lado, a los 14 días se observa una colonización bacteriana de toda la superficie de manera homogénea, con disminución de zonas de ausencia bacteriana en comparación con 7 días, con un biovolumen promedio entre cada superficie de $429.343 \mu\text{m}^3$ en tercio cervical, $434.496 \mu\text{m}^3$ tercio medio y $453.061 \mu\text{m}^3$ tercio apical, sin presentar diferencias entre ellas ($p>0.05$) (figura 5 y 6), igualmente el biovolumen aumentó con respecto a los 7 días en el tercio cervical y apical ($p=0.003$), sin embargo, a nivel del tercio medio no hubo diferencia significativa con respecto al tiempo de 7 días ($p>0.05$), (figura 7B, D y F), asimismo en estas imágenes se observa una disminución de la viabilidad bacteriana con diferencias estadísticamente significativas con respecto al biofilm de 7 días ($p< 0.0001$), con porcentajes del 69% en cervical y 72% en apical, ($p=0.003$) con porcentaje del 75% en tercio medio (figura 7), por lo que se puede apreciar disminución del color verde y aumento del color rojo. Para este tiempo de evaluación no hubo diferencias significativas entre las superficies ($p>0.05$) (figuras 5 y 6).

En contraste, a los 30 días el biovolumen aumentó notablemente en comparación con 7 días de evaluación en las tres superficies ($p< 0.0001$) y con 14 días en tercio cervical y apical ($p=0.003$) (figura 7), con biovolúmenes promedio de $534.501 \mu\text{m}^3$ en cervical, $522.913 \mu\text{m}^3$ medio y $583.407 \mu\text{m}^3$ apical, con ausencia de zonas negras observándose una cobertura total de la superficie. Igual que en 7 y 14 días en este tiempo no hubo diferencias significativas entre las superficies ($p>0.05$) (figura 6).

Opuesto a los dos tiempos anteriores, en este tiempo el porcentaje de viabilidad disminuyó, encontrando un 40% para el tercio cervical, 39% tercio medio y 43% tercio apical, siendo similares entre las tres superficies ($p>0.05$) (figura 5 y 6) y presentando diferencias significativas en comparación con 7 y 14 días en las tres superficies ($p<0.0001$) (figura 7).

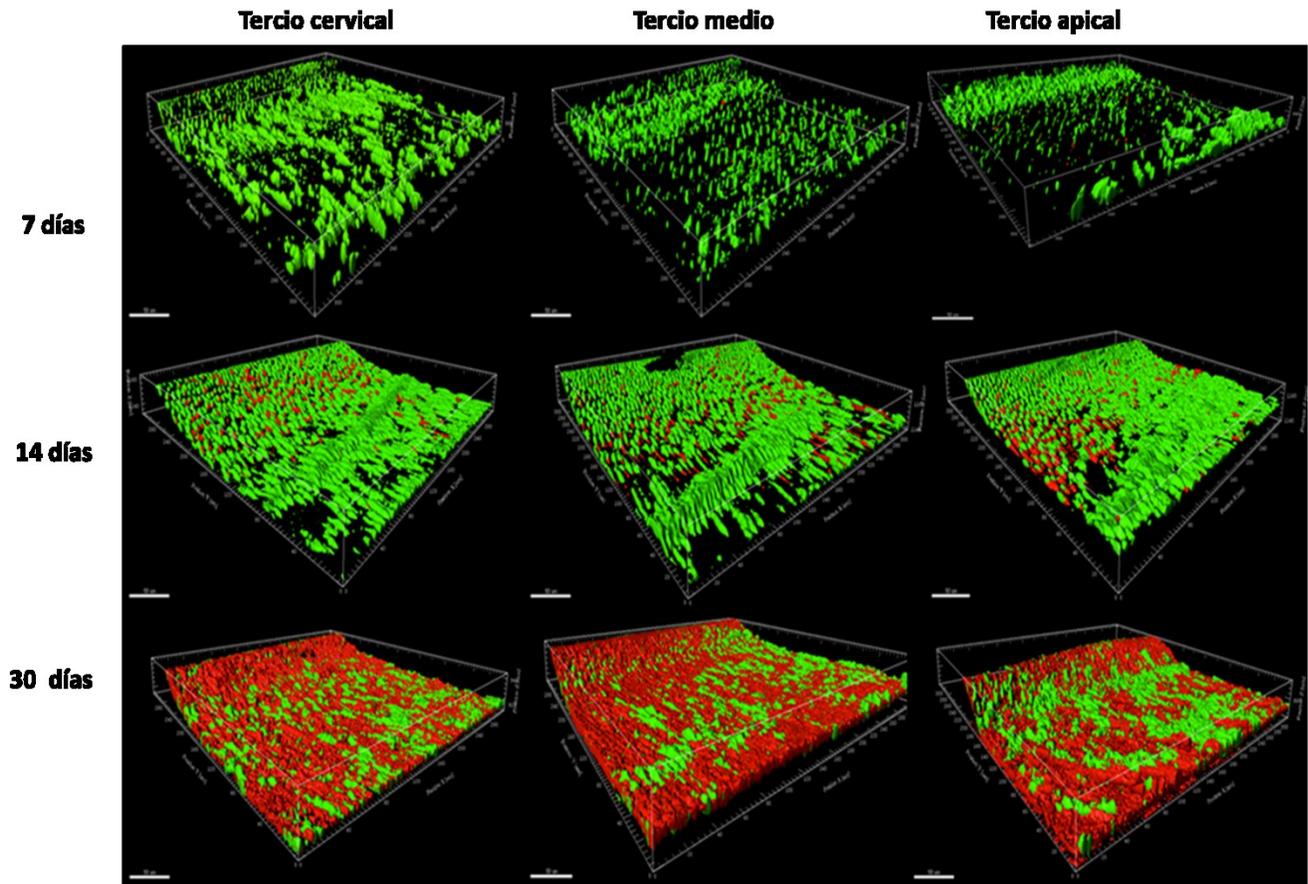


Figura 5. Reconstrucción tridimensional de imágenes de CLMS 40X. Fluorescencia verde corresponde a bacterias viables, fluorescencia roja correspondiente a bacterias no viables. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña de reconstrucciones realizadas con el software IMARIS 8.0, imágenes tomadas por el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes.

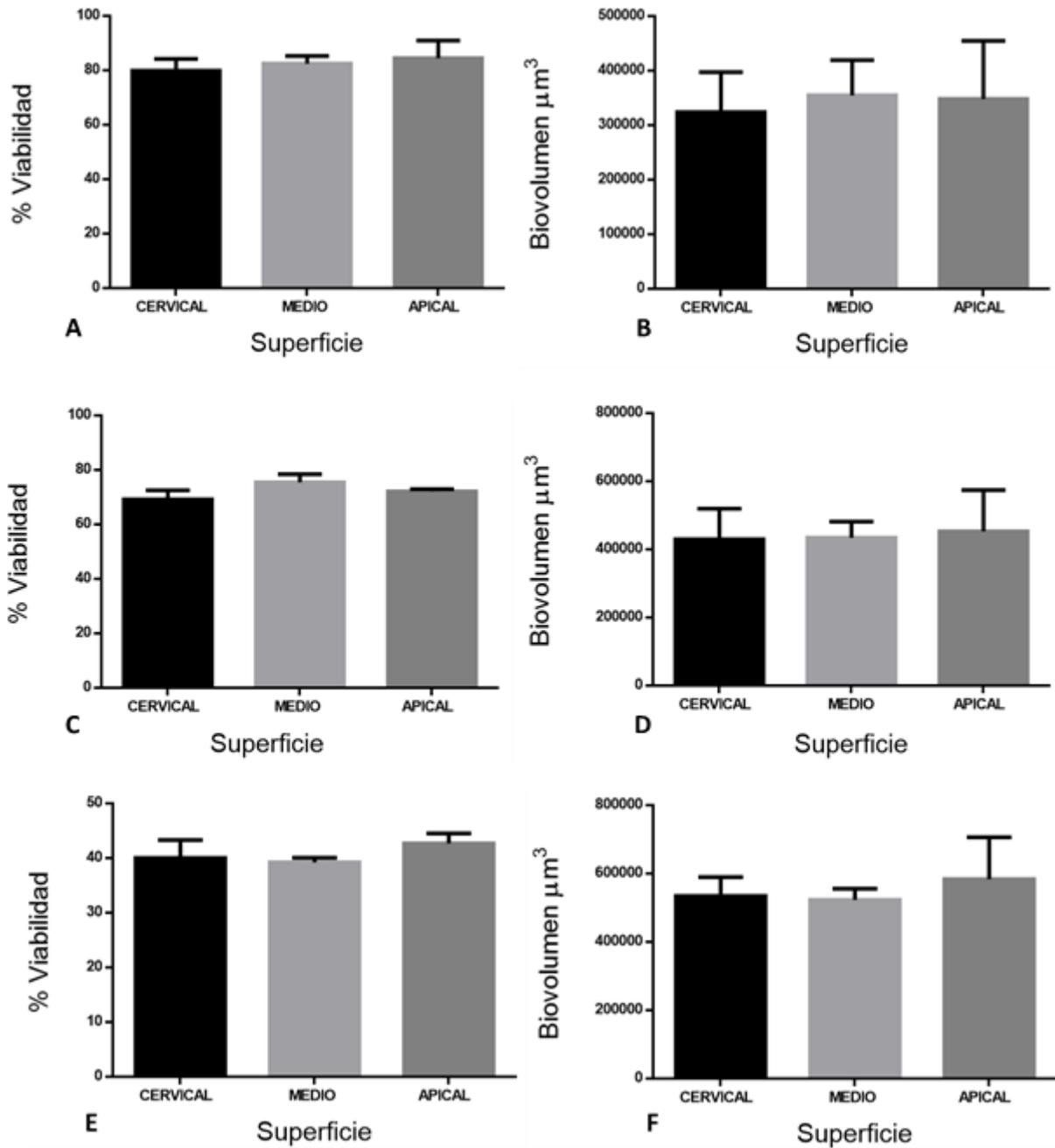


Figura 6. Porcentaje de viabilidad (%) y biovolumen (μm^3) en cada tiempo evaluado y las tres superficies. A y B: Porcentaje de viabilidad y biovolumen 7 días, C y D: Porcentaje de viabilidad y biovolumen 14 días, E y F: Porcentaje de viabilidad y biovolumen 30 días. Valor de $p < 0.05$. ANOVA de dos vías y post hoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.

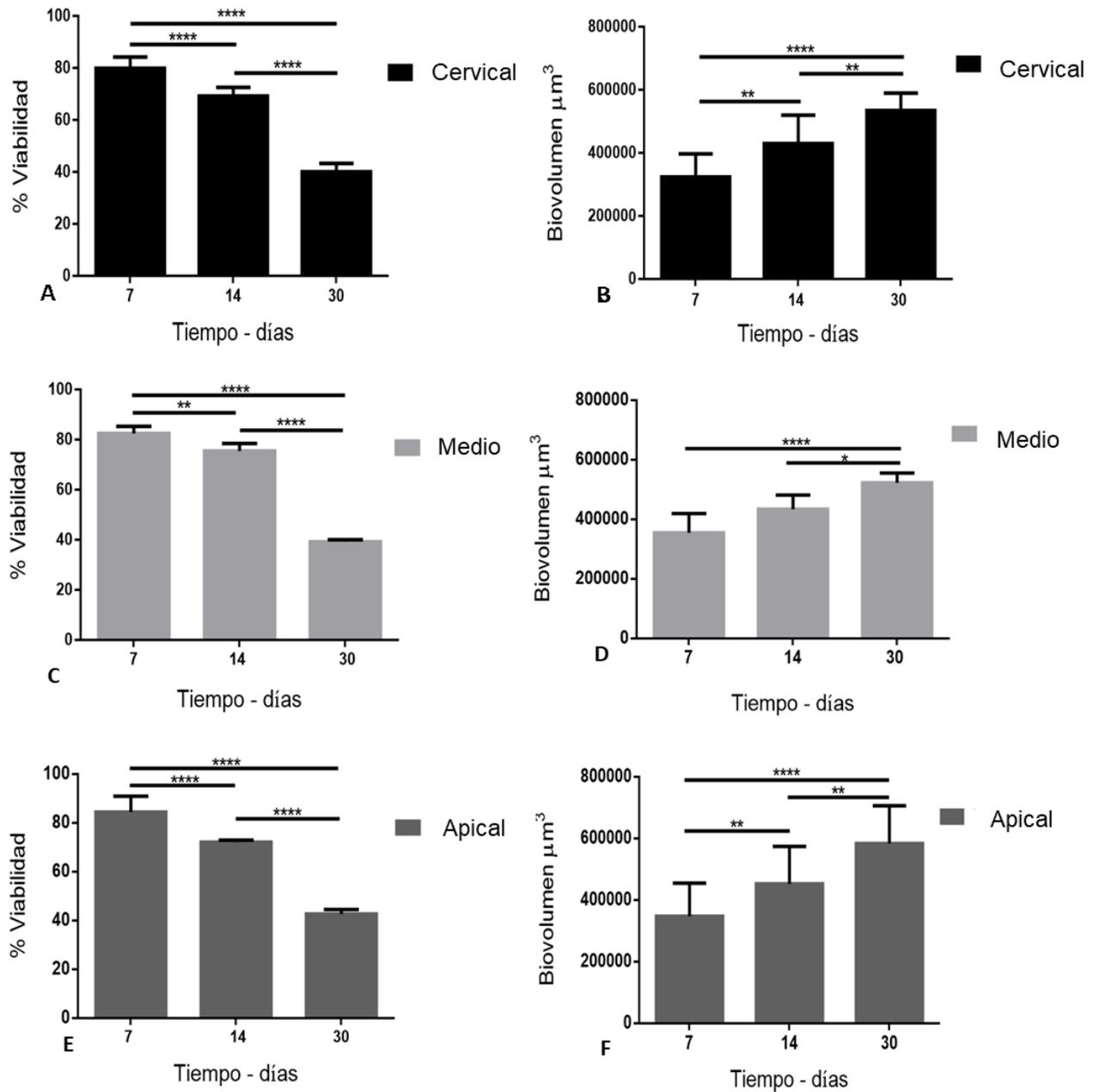


Figura 7. Porcentaje de viabilidad (%) y biovolumen (μm^3) en cada superficie en los tres tiempos evaluados. A y B: Porcentaje de viabilidad y biovolumen en cervical, C y D: Porcentaje de viabilidad y biovolumen en medio, E y F: Porcentaje de viabilidad y biovolumen en apical. Valor de $p < 0.05$. (* $p = 0.01$), (** $p < 0.005$), (**** $p < 0.0001$). ANOVA de dos vías y post hoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.

En resumen, con respecto a las superficies evaluadas, no hubo diferencias estadísticamente significativas en viabilidad y biovolumen en cada tiempo entre las superficies ($p > 0.05$), lo que indica que el biofilm se formó y creció de manera homogénea sobre toda la superficie radicular en cada uno de los tiempos evaluados (figura 6), sin embargo, entre los tiempos en cada superficie hubo diferencias significativas ($p < 0.0001$), mostrando una disminución en la viabilidad y un aumento del biovolumen a medida que aumenta el tiempo.

La reducción en la viabilidad a través del tiempo concuerda con los recuentos bacterianos, donde hay una reducción drástica en la cantidad de UFC/mL entre cada uno de los tiempos, teniendo en cuenta las superficies evaluadas, hubo una disminución homogénea y drástica de la viabilidad en todas la superficie radiculares a los 30 días ($p < 0.0001$), del mismo modo a los 14 días hubo disminución significativa en las tres superficies en comparación con 7 días, siendo mayor esta disminución a nivel cervical y apical ($p < 0.0001$) y menor en el tercio medio ($p = 0.003$); indicando que en el tercio medio las bacterias permanecen viables a los 14 días.

Contrario a la viabilidad, el biovolumen presento un aumento entre los tiempos, siendo el mayor aumento del biovolumen en todas las superficies a los 30 días ($p < 0.0001$). En el tiempo de 14 días, se observó un aumento similar en el biovolumen a nivel cervical y apical ($p = 0.003$) en contraste con el tercio medio donde no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en comparación con 7 días, es decir en esta superficie el biovolumen se mantuvo constante; adicionalmente, hubo diferencias significativas en tercio cervical y apical ($p = 0.0003$) y tercio medio ($p = 0.01$) en comparación con 30 días, indicando que a los 14 días a nivel del tercio medio, el biovolumen presento un aumento constante, intentando mantener un volumen estable.

Teniendo en cuenta lo anterior, se descartó el tiempo de 7 días, a pesar de presentar el mejor porcentaje de viabilidad y su biovolumen era adecuado, presentaba un biofilm no maduro, por lo cual no es lo ideal para evaluar eficacia de irrigantes en él y el tiempo de 30 días, a pesar de tener el mayor biovolumen entre los tiempos, la viabilidad bacteriana fue muy baja para evaluar eficacia de los irrigantes.

Igualmente, se descartó la superficie cervical y apical, por una disminución contundente de la viabilidad en comparación al tercio medio en todos los tiempos evaluados, además el biovolumen en el tercio medio durante los tres tiempos intenta mantener un volumen estable a diferencia de las otras superficies donde se ve un aumento considerable.

Tomando en consideración todos los resultados cualitativos a partir de FE-SEM y cuantitativos con CLMS, el biofilm se estableció mejor a los 14 días de incubación, con un porcentaje de viabilidad y biovolumen adecuados, con características morfológicas apropiadas y correspondientes a la formación de un biofilm maduro, para evaluar la eficacia del compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico en comparación con los otros irrigantes comúnmente utilizados en endodoncia. Teniendo en cuenta los datos arrojados entre superficies radiculares, donde se demostró una colonización bacteriana homogénea en toda la superficie radicular, en cada tiempo de evaluación, condición que fue totalmente opuesta entre cada tiempo de evaluación, donde la colonización no fue homogénea en las superficies a través del tiempo, a pesar de ello, el tercio medio demostró mejores valores de viabilidad con una disminución menor a las otras superficies entre cada tiempo y el biovolumen se mostró estable entre los tiempos.

Del mismo modo, a nivel de la superficie apical hubo hallazgos en el FE-SEM, donde se observó gran cantidad de dentina esclerótica y amplias zonas con ausencia de túbulos dentinales, donde el microorganismo no colonizó, reduciendo significativamente el área de búsqueda. Esta condición también se manifestó con el CLMS durante la captura de imágenes, lo cual dificultó y limitó considerablemente la localización y/o ubicación dentro de esta superficie radicular, para obtener las imágenes adecuadas; por estos motivos, el tercio medio radicular fue la superficie elegida para realizar el análisis a través del FE-SEM y CLMS en la evaluación de la eficacia del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico.

9.3 EVALUACIÓN DE LOS IRRIGANTES EN LA ELIMINACIÓN DEL BIOFILM

Para evaluar la eficacia de los irrigantes en la eliminación del biofilm, se realizó un análisis cualitativo sobre imágenes de FE-SEM. Adicionalmente, se analizaron los datos de porcentajes de viabilidad y biovolumen de imágenes con CLMS, en un modelo de formación de biopelícula de *E. faecalis* ATCC 29212, sobre ¼ raíces de 14 días de incubación, que posteriormente fueron expuestos a cada irrigante durante 1 minuto.

9.3.1 Análisis cualitativo de la eficacia de los irrigantes en la eliminación de la estructura y conformación del biofilm por FE-SEM

Cuando se analizan los resultados de la estructura y conformación del biofilm con BHI como control de formación de biofilm y agua control sin tratamiento, se puede observar que el *E. faecalis* está sobre la superficie dentinal formando estructuras tridimensionales y unidos entre sí por un aparente enmallado

filamentoso compatible con lo que puede ser la matriz polimérica extracelular, gran cantidad de bacterias con morfología intacta y poca cantidad de restos celulares. Lo que concuerda con lo esperado, considerando estos tratamientos como control de formación de biofilm (figura 8 A- B).

Los biofilm tratados con el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico presentaron una alta disgregación bacteriana, presencia de bacterias únicas o en pares, en conjunto con restos bacterianos; se evidencia una aparente erosión de la dentina con gran exposición de la malla colágena (figura 8C).

Por otra parte, en los biofilm tratados con CHX 2%, se evidencia la presencia de estructuras aisladas de baja elevación, con bacterias agrupadas en pequeños cúmulos o en disposición de hileras largas con poca cantidad de restos celulares, se observa una capa densa y amorfa cubriendo la totalidad de los túbulos dentinales (figura 8D), esto sugiere que la CHX no afecta a la estructura del biofilm, ya que preserva su organización y conserva bacterias con su morfología aparentemente normal.

En contraste, los biofilm expuestos a EDTA 17%, se observan túbulos dentinales parcialmente cubiertos por una delgada capa, presencia bacteriana dispuestos en hileras y presencia de múltiples restos bacterianos, ausencia de estructuras tridimensionales, lo cual indica que el EDTA tiene efecto sobre el biofilm, causando disgregación y alteración en la morfología bacteriana (figura 8E). En contraste, los biofilm tratados con NaOCl 5.25%, hay una ausencia casi total de bacterias o restos bacterianos, solo se evidencia una capa uniforme tapizando toda la superficie dentinal hasta la entrada de los túbulos generando una cobertura parcial de los mismos (figura 8F).

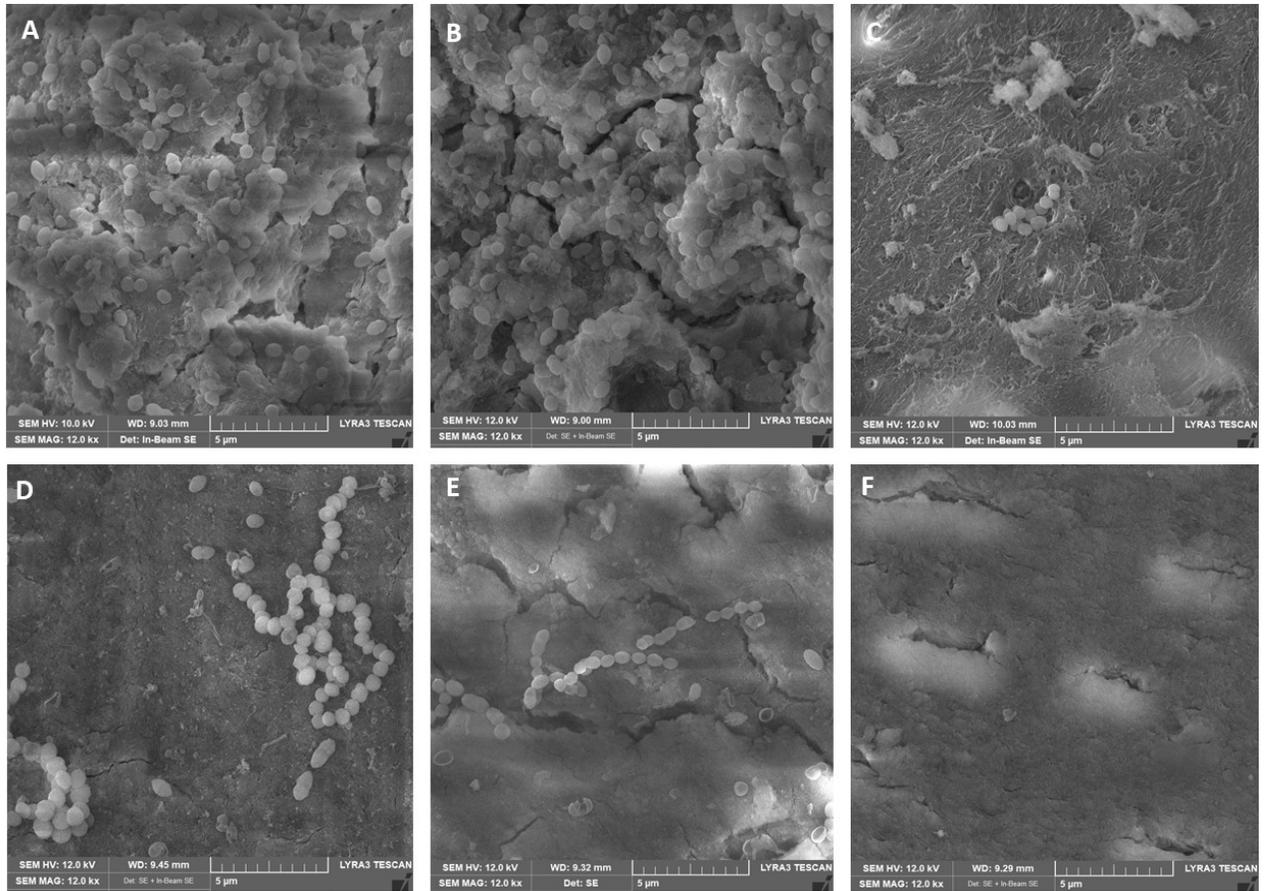


Figura 8. Eficacia de los irrigantes en la eliminación del biofilm después de 1 minuto exposición. A: Control de formación de biofilm (BHI), B: Control sin tratamiento (agua), C: Compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, D: CHX 2%, E: EDTA 17%, F: NaOCl 5.25%. FE-SEM 12000X. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña, captura de imágenes de microscopía electrónica de barrido con el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes.

9.3.2 Análisis cuantitativo de la viabilidad bacteriana y biovolumen mediante CLMS.

Para analizar la viabilidad bacteriana y el biovolumen, se analizaron tres imágenes aleatorias del tercio medio por cada tratamiento, teniendo en cuenta que el color verde, permite identificar las bacterias viables y el color rojo las bacterias inviables en cada uno de irrigantes utilizados para eliminar el biofilm.

En el control de formación del biofilm (BHI) y el control sin tratamiento (agua), se evidencia un volumen que cubre la totalidad de la superficie, con muy pocas zonas de ausencia bacteriana, indicando una colonización homogénea en ambos grupos, con un biovolumen promedio de $449.180 \mu\text{m}^3$ para el BHI y $441.337 \mu\text{m}^3$ para el agua, con un porcentaje de viabilidad de 77 y 76% respectivamente por lo que predomina el color verde y hay muy poca presencia del color rojo, indicando mayor proporción de bacterias viables, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de viabilidad ni en

el biovolumen entre los biofilm con BHI y agua ($p > 0.05$), (figura 10 A y B); por consiguiente estos resultados concuerdan con la adecuada formación del biofilm para el caso del BHI y para el agua indicando que el tratamiento con esta sustancia no afecta el biofilm, por lo que se puede afirmar que los resultados obtenidos no son producto de la manipulación durante la irrigación (figura 9 A y B). Adicionalmente, cuando se realizó el tratamiento con el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico, se redujo significativamente el biovolumen ($14.555 \mu\text{m}^3$) con respecto a BHI ($p < 0.0001$), agua ($p < 0.0001$), CHX ($p < 0.0001$) y EDTA ($p < 0.0001$), y presenta un efecto de disgregación del biofilm similar a la del NaOCl 5.25% ($p = 0.0001$). Adicionalmente, aunque la cantidad de biofilm presente es muy poco no se afecta la viabilidad bacteriana con un porcentaje del 79% de manera similar la viabilidad encontrada con BHI y agua ($p > 0.05$), (figura 10 A y B). Por lo anterior, éste compuesto elimina y disgrega notablemente el biofilm, pero permite la persistencia de bacterias viables después del tratamiento (figura 9C).

En contraste, la CHX 2%, evidencia una disminución del biovolumen con respecto al BHI ($p < 0.0001$) y el agua ($p < 0.0001$), a pesar de que hay diferencias estadísticamente significativas con el EDTA ($p < 0.0001$) y con el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico ($p < 0.0001$), el biovolumen no disminuye tanto como con estas dos sustancias, encontrándose un biovolumen de $330.520 \mu\text{m}^3$ (figura 10B), por otra parte el porcentaje de viabilidad disminuye un poco (71%), en comparación con el BHI y agua encontrando diferencias significativas para estos controles ($p = 0.002$), ($p = 0.004$), por lo que se puede concluir que la CHX no tiene capacidad de eliminar el biofilm, ya que no disminuye completamente el biovolumen y ni afecta de manera contundente la viabilidad bacteriana, condición que comparte con el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico (figura 9D).

Por su parte, el EDTA al 17%, disminuye notablemente el biofilm ya que se puede observar aproximadamente el 70% de la zona sin bacterias, lo que se refleja con una significativa disminución del biovolumen de $46.852 \mu\text{m}^3$ total en comparación con CHX 2% ($p < 0.0001$), BHI ($p < 0.0001$) y agua ($p < 0.0001$), (figura 10 B). En cuanto a la viabilidad bacteriana es del 45% por lo que se observa una proporción casi igual entre el color verde y rojo en las imágenes, de acuerdo con esto el EDTA elimina moderadamente el biofilm, disminuyendo considerablemente el biovolumen y manteniendo el porcentaje de viabilidad por debajo del 50%, (figura 9E), presentando diferencias estadísticamente significativas con el BHI ($p < 0.0001$), agua ($p < 0.0001$) y CHX ($p < 0.0001$) (figura 10A).

Por último, en el NaOCl 5.25%, predomina la zona negra correspondiente a la ausencia bacteriana que abarca aproximadamente el 95% de la superficie, con un biovolumen promedio de $3.866 \mu\text{m}^3$ lo que confirma los hallazgos observados con FE-SEM en donde se ve una eliminación de casi todo el biofilm previamente formado, presentando diferencias estadísticamente significativas con BHI ($P < 0.0001$), agua ($p < 0.0001$), CHX ($p < 0.0001$), EDTA ($p < 0.0001$) y con el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico ($p = 0.0001$), (figura 10B), debido a la ausencia de bacterias no se logran apreciar la tinción verde y muy pocas bacterias con la tinción roja, lo que concuerda con el porcentaje de viabilidad del 1%, por lo que se concluye que el NaOCl 5.25%, elimina prácticamente la totalidad del biofilm con tan solo un minuto de tratamiento, mostrando una mortalidad bacteriana del 99 % (figura 9F) y presentando diferencias estadísticamente significativas con los otros tratamientos (figura 10A).

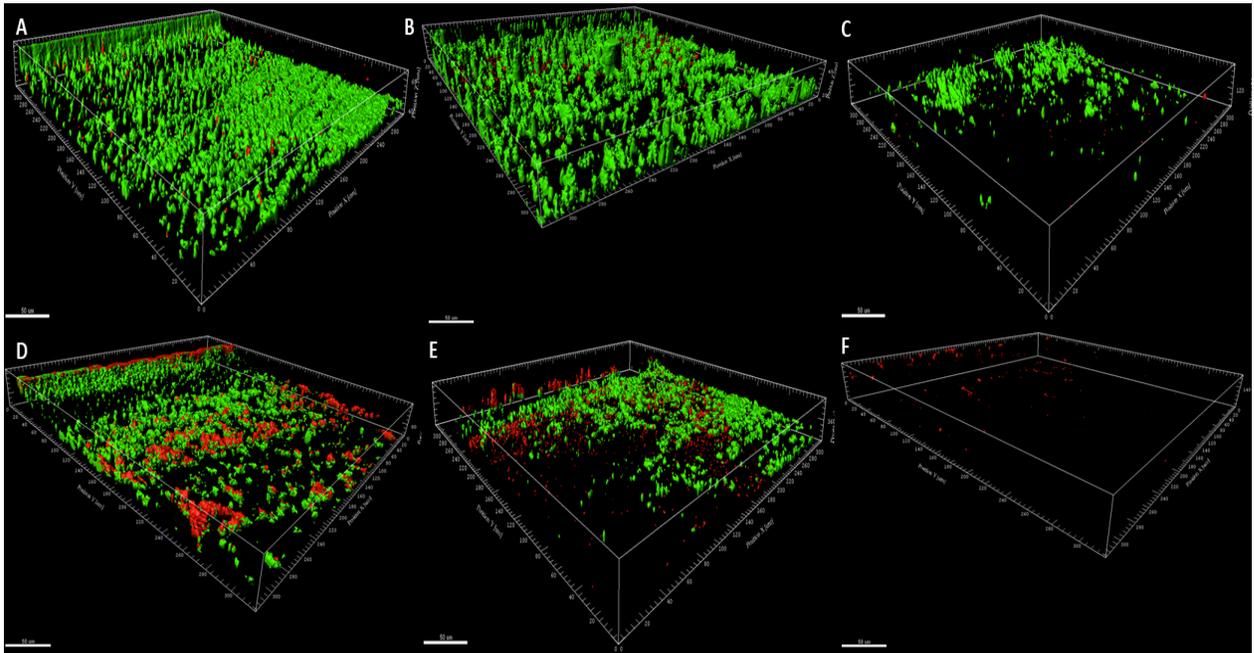


Figura 9. Reconstrucción tridimensional de imágenes CLMS 40X. Biofilms después del tratamiento con los irrigantes por 1 minuto. A: Control de formación de biofilm (BHI), B: Control sin tratamiento (agua), C: Compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, D: CHX2%, E: EDTA 17%, F: NaOCl 5.25%. Fluorescencia verde corresponde a bacterias vivas, fluorescencia roja correspondiente a bacterias muertas. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña de reconstrucciones realizadas con el software IMARIS 8.0, imágenes tomadas bajo el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes.

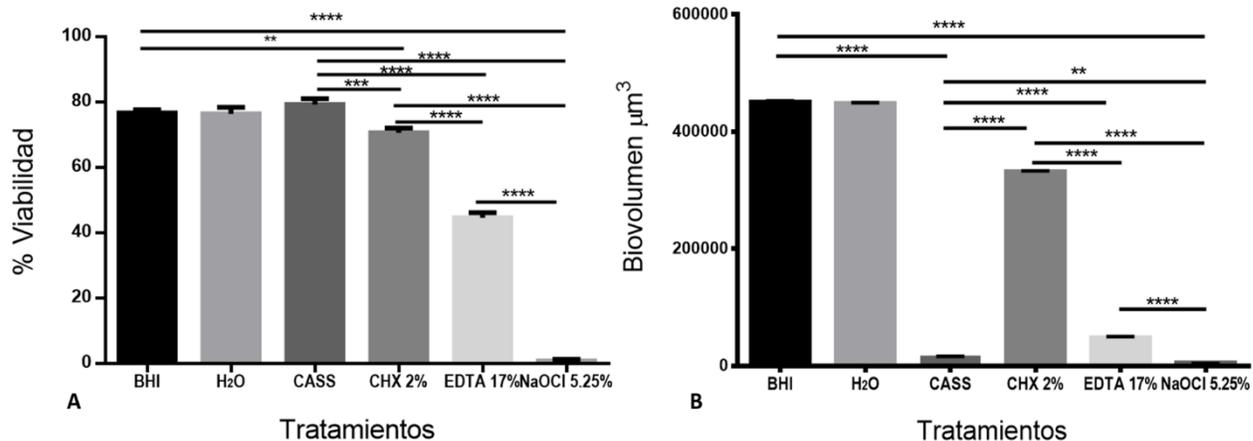


Figura 10. Eficacia de los irrigantes BHI, agua, compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico (CASS), CHX 2%, EDTA 17%, NaOCl 5.25%, en la eliminación de biofilm. A: Porcentaje de viabilidad (%), B: Biovolumen (μm^3). Valor $p > 0.05$, ** ($p > 0.001$) **** ($p < 0.0001$). ANOVA de una vía con posthoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo la supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.

9.4 EVALUACIÓN DE LOS IRRIGANTES EN LA INHIBICIÓN DEL BIOFILM

Para evaluar la eficacia de los irrigantes en la inhibición del biofilm, se realizó un análisis cualitativo sobre imágenes de FE-SEM y además se analizaron los datos de porcentajes de viabilidad y biovolumen de imágenes de CLMS, en un modelo de formación de biofilm de *E. faecalis* ATCC 29212, de 14 días de incubación, sobre $\frac{1}{4}$ raíces expuestas a cada irrigante durante 1 minuto previamente a la colocación del inóculo bacteriano. Se tomaron tres imágenes aleatorias de tercio medio por cada tratamiento.

9.4.1 Análisis cualitativo de la eficacia de los irrigantes en la inhibición de la estructura y conformación del biofilm por FE-SEM

Al analizar las imágenes para evaluar estructura y conformación del biofilm con BHI como control de formación y agua como control sin pretratamiento, se evidencia la presencia del *E. faecalis* sobre la superficie dental, agregados en estructuras tridimensionales, unidos entre sí por un enmallado filamentososo con muy poca cantidad de restos bacterianos, presencia de una capa cubriendo la superficie dental ocultando parcialmente la entrada de los túbulos dentinales. Lo anterior es esperado considerando estos tratamientos como controles de formación de biofilm, del mismo modo concuerda con las imágenes de los controles del experimento de eliminación (figura 11A y B).

Los cuartos de raíz tratados con el compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, evidencia una aparente erosión severa de la superficie dentinal con deformación del contorno en los túbulos dentinales, no hay agregación bacteriana, sin embargo, se observan *E. faecalis*, de manera individual o en pares (figura 11C).

Por otra parte, los pre-tratados con CHX2%, se observan estructuras aisladas de poca elevación, gran cantidad de restos bacterianos y bacterias con alteraciones morfológicas importantes como fusiones atípicas, dando la apariencia de bacilos, pérdida o deformación del septo central, presencia de poros y grietas en la membrana celular, también se observa una capa densa y amorfa tapizando la superficie dentinal (figura 11D).

En contraste, los pre-tratados con EDTA 17%, se observan los túbulos dentinales cubiertos por una capa amorfa e irregular, gran colonización bacteriana sin alteración en su morfología agrupadas en pares, en conjunto con restos bacterianos en dentina intratubular e intertubular (figura 11E).

Finalmente, los pre-tratados con NaOCl 5.25%, presenta una leve exposición de malla la colágena dentinal más no erosión de esta, entrada de los túbulos dentinales despejados, aunque con alteraciones morfológicas que se pueden evidenciar al comprar esta imagen con la imagen sin biofilm de la figura 4 A, E, I, se observa la presencia de *E. faecalis* agrupados en hileras cortas o agregados en pequeñas estructuras aisladas, aunque si hay colonización bacteriana (figura 11F).

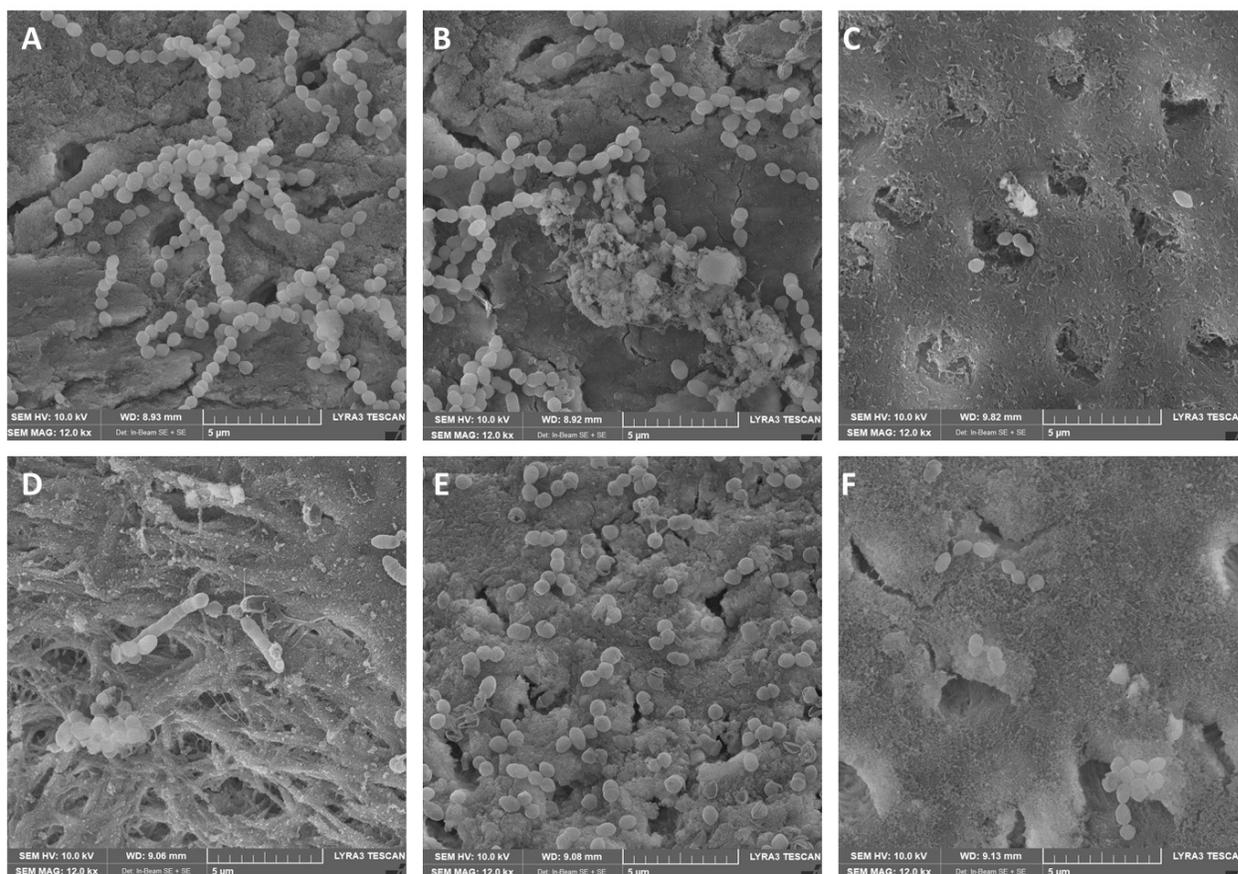


Figura 11. Capacidad de los irrigantes en la inhibición de formación del biofilm con previo tratamiento por 1 minuto. A: Control de formación de biofilm (BHI), B: Control sin pre-tratamiento (agua), C: Compuesto de ácido sulfónico sulfúrico, D: CHX 2%, D: EDTA 17%, E: NaOCl 5.25%. FE-SEM 1200X. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña, captura de imágenes de microscopía electrónica de barrido con el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes.

9.4.2 Análisis de la viabilidad bacteriana y biovolumen mediante CLMS.

En base a las reconstrucciones tridimensionales de las imágenes de CLMS, se evaluó la viabilidad bacteriana y biovolumen, teniendo en cuenta la proporción de color verde y color rojo para cuantificar la cantidad de bacterias viables e inviables de cada uno de irrigantes utilizados para inhibir la formación del biofilm.

Se tuvieron dos controles el primero como control de formación de biofilm (BHI) y el segundo como control sin pretratamiento (agua), se observa un patrón de colonización bacteriana homogénea en ambos grupos, con un biovolumen promedio de $462.934 \mu\text{m}^3$ y $439.756 \mu\text{m}^3$, con un porcentaje de viabilidad de 74 y 73% respectivamente, donde predomina el color verde cubriendo toda la superficie, con pequeñas zonas de

color rojo, mostrando mayor proporción de bacterias viables (figura 12 A y B), no hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de viabilidad ni en el biovolumen ($p > 0.05$), lo cual indica una adecuada formación del biofilm de acuerdo con el control de formación y que el pretratamiento con agua no inhibe la formación del biofilm, estos resultados concuerdan con los obtenidos en los controles de eliminación (figura 13 A y B).

Al analizar la superficie dentinal pre tratada con el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico, inhibió significativamente el biovolumen con respecto al control de formación de biofilm ($p < 0.0001$), al pretratamiento con agua ($p < 0.0001$), CHX al 2% ($p < 0.0001$) y EDTA ($p < 0.0001$) con un biovolumen de $23.345 \mu\text{m}^3$, y tiene capacidad de inhibición en la formación del biofilm. Aunque el NaOCl también tiene capacidad de inhibir la formación del biofilm, se puede evidenciar un biovolumen mayor ($53.506 \mu\text{m}^3$) que con compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico por lo que se evidencian diferencias estadísticamente significativa en cuanto al biovolumen ($p = 0.01$); sin embargo, este compuesto no inhibe la viabilidad bacteriana, con un porcentaje de viabilidad del 84%, a pesar de disminuir el biovolumen de manera importante, la viabilidad es superior incluso a la de los controles presentando diferencias estadísticamente significativas con el control de formación de biofilm ($p < 0.0001$) y el control del pretratamiento con agua ($p < 0.0001$) (figura 13 A y B). Por lo anterior, el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico inhibe la agregación bacteriana, mas no la colonización bacteriana, por la presencia de bacterias viables (figura 12 C).

En cuanto al pretratamiento con CHX 2%, hay una disminución considerable en el volumen total del biofilm en comparación con el control de formación biofilm ($p < 0.0001$), el pretratamiento con agua ($p < 0.0001$) y EDTA ($p < 0.0001$), con un biovolumen de $164.602 \mu\text{m}^3$, sin embargo, la CHX tiene menor capacidad de inhibición en comparación con el compuesto de ácido sulfónico /sulfúrico y el NaOCl, aunque presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) (figura 13B). Por otro lado, el porcentaje de viabilidad se reduce bastante (44%), comparado con el control de formación de biofilm ($p < 0.0001$), pretratamiento con agua ($p < 0.0001$), compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico ($p < 0.0001$), EDTA ($p < 0.0001$), y el NaOCl ($p < 0.0001$) (figura 13A). Este irrigante mostró tener la mejor capacidad para inhibir la viabilidad bacteriana en comparación con los demás irrigantes evaluados, aunque se mantiene la formación del biofilm (figura 12D).

Por su parte, el pretratamiento con el EDTA 17%, inhibe moderadamente el volumen total con respecto al control de formación de biofilm ($p < 0.0001$) y al pre-tratamiento con agua ($p < 0.0001$) con un biovolumen de $337.624 \mu\text{m}^3$, la inhibición en la formación de biofilm es mucho menor respecto a el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico, la CHX y el NaOCl aunque muestra diferencias estadísticamente significativas

($p < 0.0001$) (figura 13B), el EDTA inhibe un poco la viabilidad bacteriana con respecto al control de formación de biofilm ($p = 0.01$) y al pre-tratamiento con agua ($p = 0.01$) con un porcentaje de viabilidad del 69%, predominando el color verde en toda la superficie con muy pocas zonas rojas, indicando mayor presencia de bacterias viables (figura 12E), adicionalmente, el EDTA tiene poca capacidad de inhibir la viabilidad en comparación con la CHX ($p < 0.0001$), sin embargo el porcentaje de viabilidad fue menor en comparación con el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico ($p < 0.0001$) y el NaOCl ($p < 0.0001$) (figura 13A), por todo lo anterior el EDTA no inhibe la formación de biofilm, ya que no hubo una disminución considerable en el biovolumen y el porcentaje de viabilidad está por encima del 60% (figura 12E).

Por último, el pretratamiento con NaOCl 5.25%, muestra grandes zonas de ausencia bacteriana, pero no más que las mostradas por el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico, presenta una inhibición notable del volumen total con un biovolumen promedio de $53.506 \mu\text{m}^3$ (figura 12F), en comparación con el control de formación del biofilm ($p < 0.0001$), pretratamiento con agua ($p < 0.0001$), CHX ($p < 0.0001$) y EDTA ($p < 0.0001$), sin embargo, la inhibición fue similar a la mostrada por el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico aunque alcanza a encontrarse diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.01$) (figura 13B). Al mismo tiempo, predomina la proporción de color verde, indicando mayor cantidad de bacterias viables, lo que coincide con el porcentaje de viabilidad del 94 %. Por lo anterior, el NaOCl 5.25% tiene una capacidad de inhibir la formación de biofilm, inhibiendo moderadamente la agregación bacteriana, sin embargo, no inhibe la colonización bacteriana permitiendo que el *E. faecalis* se adhiera a la dentina, manteniendo su viabilidad, lo que facilita su agregación (figura 12F).

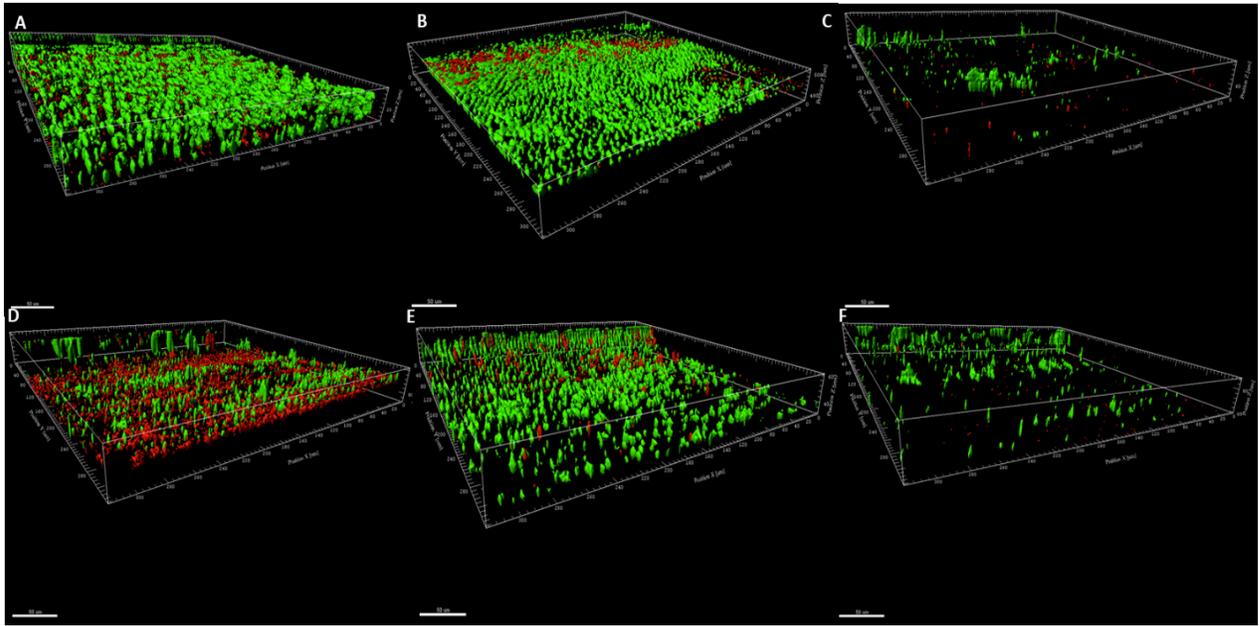


Figura 12. Reconstrucción tridimensional de imágenes de CLMS 40X. En $\frac{1}{4}$ de dientes con tratamiento previo por 1 minuto con los irrigantes antes de 14 días de incubación. A: Control de formación de biofilm (BHI), B: Control sin pretratamiento (agua), C: Compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, D: CHX 2%, E: EDTA 17%, F: NaOCl 5.25%. Fluorescencia verde corresponde a viabilidad bacteriana, fluorescencia roja a no viabilidad bacteriana. Figura realizada por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña de reconstrucciones realizadas con el software IMARIS 8.0, imágenes tomadas bajo el servicio técnico contratado por el instituto UIBO con μ -core Centro de Microscopía – Universidad de los Andes.

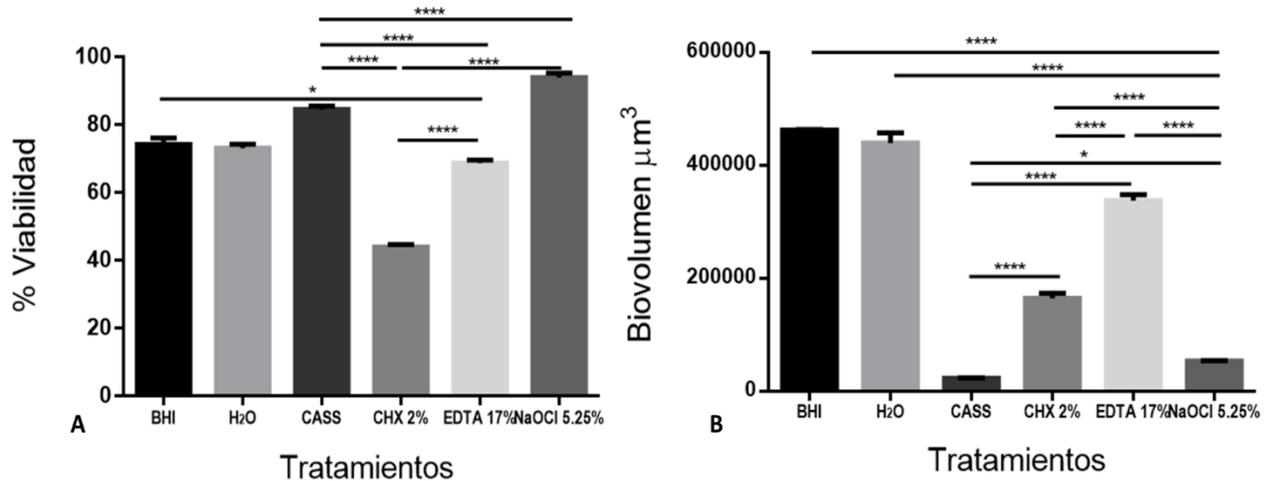


Figura 13. Capacidad de los irrigantes BHI, agua, compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico (CASS), CHX 2%, EDTA 17%, NaOCl 5.25%, en la inhibición de biofilm. A: Porcentaje de viabilidad (%), B: Biovolumen (μm^3). Valor $p < 0.05$, * ($p=0.001$) **** ($p<0.0001$). ANOVA de una vía con post hoc Tukey. Figura y análisis estadístico realizado por Diana Marcela Gutiérrez Saldaña bajo supervisión de la Dra. Gloria Inés Lafaurie.

10. DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró la estandarización de un modelo de biofilm monoespecie de *E. faecalis* sobre dentina en cuartos de raíz de dientes premolares inferiores, la evaluación de viabilidad bacteriana, biovolumen y características morfológicas, determinó que este modelo de formación de biofilm endodóntico *in vitro*, fue reproducible ya que no se encontró variabilidad entre las réplicas realizadas, permitiendo una colonización homogénea en toda la superficie radicular en cada tiempo evaluado. Por otro lado, este modelo al no tener recambio de nutrientes permitió evaluar la resistencia y dinámica de colonización del microorganismo sin condicionarlo, este modelo es respaldado con los resultados de Niazi *et al.*, (2014) quienes confirman que a los 14 días en un biofilm multiespecie la viabilidad bacteriana se mantiene cerca de un 90%. Los modelos con recambio de medio a pesar de que buscan garantizar el mantenimiento de células viables, previniendo la deficiencia nutricional (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013), tienen una desventaja como que no se podría extrapolar a la condición clínica, en la que las bacterias se encuentran en estrés nutricional. Estudios previos han evaluado diferentes tiempos de formación de biofilm y han reportado que a los 14 días de incubación se establece un biofilm maduro (Sun *et al.*, 2011, Guerreiro – Tanomaru *et al.*, 2013), los cuales coinciden con los resultados de este trabajo donde el biofilm se estableció mejor a los 14 días con una viabilidad bacteriana y biovolumen adecuados con características morfológicas apropiadas; donde el *E. faecalis* colonizo de manera homogénea toda la superficie radicular.

Lograr una colonización bacteriana homogénea en los modelos de biofilm, es un aspecto importante, este trabajo demostró que el biofilm se formó y creció de manera homogénea sobre toda la superficie radicular, ya que no hubo diferencias significativas en viabilidad y biovolumen entre las superficies en cada tiempo de evaluación ($p > 0.05$), en cambio, se encontraron diferencias significativas en viabilidad y biovolumen en las superficies evaluadas (cervical, medio y apical) entre los tiempos (7, 14 y 30 días) ($p < 0.0001$), mostrando una disminución en la viabilidad y un aumento del biovolumen a medida que aumenta el tiempo, condición que reporta (Ghorbanzadeh *et al.*, 2020) donde observó una diferencia significativa entre los tercios cervical, medio y apical en la cantidad de biofilm formado a los 4 días y a las 4 semanas ($P < 0.001$).

Teniendo en cuenta cada superficie, en el tercio cervical se observó una disminución considerable de la viabilidad y un aumento notable del biovolumen en cada tiempo, comportamiento que fue similar a nivel del tercio apical ($p < 0.0001$), a nivel del tercio medio, hubo una disminución significativa de la viabilidad ($p = 0.003$) y el biovolumen se mantuvo estable, ya que no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) en comparación al biovolumen de 7 días. Estos resultados, apoyaron la elección del tercio medio radicular,

para la evaluación de la eficacia del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico y compararlo con las sustancias irrigadoras convencionales, ya que mostro menor disminución de la viabilidad bacteriana a medida que pasa el tiempo con respecto al tercio cervical y apical e igualmente el biovolumen se mantuvo estable en comparación a las otras superficies, descartando el tercio cervical y apical, adicionalmente hallazgos del FE-SEM, a nivel del tercio apical, donde se encontró abundante dentina esclerótica, poca presencia de túbulos dentinales y una colonización bacteriana escasa e irregular, ratifico la no elección del tercio apical y estos hallazgos coinciden con estudios previos donde tienen el mismo criterio para descartar el análisis del tercio apical o eliminarlo del modelo (Ma *et al.*, 2011, Wu *et al.*, 2014).

La capacidad del *E. faecalis* de colonizar, invadir, sobrevivir y conformar un biofilm monoespecie en los túbulos dentinales, es un hecho que se ha reportado ampliamente (Segdley *et al.*, 2005; Siqueira *et al.*, 2004), este microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir a ambientes hostiles como escasas de nutrientes, alta salinidad y pH extremo (Koch *et al.*, 2004; Pillar *et al.*, 2004), por lo que el modelo propuesto en este trabajo sin cambio de nutrientes resulta ser adecuado para semejar las condiciones clínicas reales. Adicionalmente, la capacidad que tiene esta bacteria de conformar biofilm les confiere una resistencia a las múltiples sustancias antimicrobianas utilizadas regularmente durante la preparación biomecánica, como el NaOCl, CHX, EDTA. Para evaluar la efectividad de estos irrigantes se han desarrollado múltiples modelos *in vitro*, empleando el sustrato ideal (dentina radicular) de diferentes formas: discos (Hapassalo *et al.*, 1987; Yap *et al.*, 2014), matrices (Dunavant *et al.*, 2006), semicilindros (Ma *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014; Louwakul *et al.*, 2016) bloques (Wang *et al.*, 2012; Guerreiro- Taomaru *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2018), semiraices (Fan *et al.*, 2014) y raíces (Ye *et al.*, 2018), también, se han implementado múltiples modelos de infección como el sistema de flujo continuo (Dunavant *et al.*, 2006, Yap *et al.*, 2014), la incubación con centrifugación (Ma *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Guerreiro- Taomaru *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016; Louwakul *et al.*, 2016) e incubación con recambio de medio (Wang *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2018). Esta diversidad de modelos también ha generado una amplia variabilidad en los resultados en la eficacia de las sustancias antimicrobianas usadas en la eliminación de esta bacteria, por lo que en este trabajo se evaluaron diferentes tiempos de formación del biofilm y superficie para optimizar las mejores condiciones para la evaluación de sustancias antimicrobianas.

El recuento bacteriano, es un método utilizado para monitorear el crecimiento bacteriano o para calcular el número de supervivientes a una determinada condición, por lo cual no mide el número total de bacterias sino únicamente las viables (Aguirre *et al.*, 2012) y puede sobre estimar la cantidad de bacterias debido a

que podría formarse este biofilm no solo sobre el conducto radicular sino también en el esmalte, en modelos en los que se embeben los dientes en medio nutricional con *E. faecalis* y todo el diente está expuesto al medio (Swimberghe *et al.*, 2019). Con el fin de favorecer el crecimiento del microorganismo únicamente en la dentina del conducto de cada diente, en este trabajo inicialmente los dientes fueron decoronados retirando el esmalte dejando solo la dentina radicular, que posteriormente se incubaron en los tubos colocados de manera horizontal con el conducto hacia abajo, para que los microorganismos estuvieran en contacto directo con la dentina previamente instrumentada. El recuento presentó una reducción significativa en la cantidad de UFC/mL a medida que aumentaba el tiempo, lo cual es concordante con un modelo de inanición y restricción nutricional (Niazi *et al.*, 2014). Estos resultados fueron corroborados con experimentos de viabilidad bacteriana, donde se determinó que el porcentaje de viabilidad promedio disminuía considerablemente con los tiempos de formación de biofilm a los 7, 14 y 30 días en cada una de las superficies radiculares cervical (80%, 69%, 40%), medio (82%, 75%, 39%) y apical (84%, 72%, 43%).

Este trabajo adicionalmente confirmó la presencia del *E. faecalis* sobre la dentina a través de FE-SEM, donde se evidenció de manera muy clara, la capacidad que tiene este microorganismo de colonizar e invadir los túbulos dentinales desde los 7 días y de conformar un biofilm monoespecie, condición que se observó claramente a partir de los 14 días, con presencia de estructuras tridimensionales con alta agregación bacteriana unidas entre sí por una matriz polimérica extracelular, hallazgos reportados por otros autores (Siqueira *et al.*, 2004; Segdley *et al.*, 2005; Clegg *et al.*, 2006), por otra parte esta conformación de biofilm de 14 días de incubación fue reproducible, ya que se pudo confirmar valores de biovolumen ($434.496\mu\text{m}^3 \pm 67.183 \mu\text{m}^3$ con un coeficiente de variación de 0,15) y viabilidad bacteriana ($75\% \pm 4,1\%$ con un coeficiente de variación de 0,05) muy similares entre las réplicas.

Se confirmó que la viabilidad en promedio a los 30 días en el tercio medio descendía de manera drástica (39%) pero el biovolumen aumentaba ($522.913 \mu\text{m}^3$), en comparación con los 14 días que presentó una viabilidad más alta (75%) pero un biovolumen más bajo ($434.496 \mu\text{m}^3$) ($p= 0.01$), aunque a los 7 días de formación del biofilm la viabilidad fue mayor (82%) el biovolumen por su parte fue inferior ($354.671\mu\text{m}^3$), de acuerdo con estos hallazgos se escogió el biofilm de 14 días en el tercio medio, para cumplir con el objetivo de estudio que fue comparar la eficacia de un compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico con irrigantes antimicrobianos usados durante el tratamiento convencional sobre *E. faecalis* en un modelo de biofilm endodóntico *in vitro*.

Inicialmente se valuó la capacidad del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico en comparación con los irrigantes convencionales para la eliminación del biofilm de *E. faecalis* formado con las condiciones previamente estandarizadas, se pudo confirmar que este compuesto eficaz en eliminar el biofilm, afectando el biovolumen ($14.555 \mu\text{m}^3$) en comparación al control de formación de biofilm ($449.180 \mu\text{m}^3$) ($p < 0.0001$) o del control sin tratamiento (agua) ($441.337 \mu\text{m}^3$) ($p < 0.0001$), esta gran capacidad de disgregación, puede ser atribuida a su mecanismo de acción que se denomina desbridamiento de choque por deshidratación, el cual puede afectar directamente la matriz polimérica extracelular, que consta de exopolisacáridos, proteínas extracelulares y ácidos nucleicos (Rabin *et al.*, 2015). En el biofilm de *E. faecalis* estos exopolisacáridos están compuestos de manosa, galactosa, glucosa, N-acetil-glucosamina, ácido galacturónico, fucosa, arabinosa, ramnosa y xilosa (Bales *et al.*, 2013), moléculas que pueden verse afectadas directamente por acción del ácido sulfúrico, el cual tiene un efecto deshidratante sobre moléculas hidrocarbonadas, es decir es capaz de captar sus moléculas en forma de agua, dejando libre los átomos de carbono, alterando la estructura de la matriz, del mismo modo los otros componentes del compuesto como lo son los ácidos sulfónicos, podrían desnaturalizar proteínas extracelulares de este microorganismo fundamentales para este fin, como la proteína de superficie enterococal (Esp) (Taglialegna *et al.*, 2020), facilitando la disgregación bacteriana (Sahni *et al.*, 2016), sin embargo, el poco biofilm que alcanza a quedar formado continua siendo viable por lo que se puede afirmar que este compuesto no afectó la viabilidad bacteriana con un porcentaje del 79%. Este compuesto es considerado como una sustancia no antibiótica de acuerdo con lo reportado en la ficha técnica el producto (EPIEN Inc., 2015) ya que permite la persistencia de bacterias viables lo que no es ideal en los tratamientos endodónticos, este resultado contrasta con los reportados por Ye *et al.*, 2016, donde evaluaron este compuesto en un modelo de infección con *E. faecalis* de 4 semanas de incubación a nivel del itsmo, conducto radicular y dentro de los túbulos dentinales, calculando el porcentaje de bacterias muertas, el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico mostró un porcentaje de mortalidad en el itsmo ($32.0 \pm 5.1\%$) en el conducto radicular ($43.8 \pm 6.1\%$) y dentro de los túbulos ($49.5 \pm 3.9\%$) de estos tres valores el porcentaje de viabilidad del conducto radicular es el que se tuvo en cuenta para comparar con el resultado de este estudio, la diferencia entre estos resultados pudo presentarse en la forma de calcular el porcentaje de bacterias vivas y muertas, en este estudio se calculó la viabilidad bacteriana a partir del volumen de fluorescencia verde del biovolumen total obtenido en la reconstrucción tridimensional de la imagen del CLMS, en comparación con el estudio de Ye *et al.*, donde calcularon con la fórmula de fluorescencia roja/fluorescencia roja + fluorescencia verde el porcentaje de bacterias muertas, del mismo modo calcularon un espesor de biofilm

aproximado de 11 – 12 μm , lo que difiere de este trabajo donde se evaluó biovolúmenes totales para evaluar la eficacia en la eliminación del biofilm el cual es una estructura tridimensional en μm^3 .

Cuando se evaluó el NaOCl 5.25% uno de los irrigantes endodónticos más usados, se pudo confirmar su excelente capacidad de erradicación de biofilm y efecto antimicrobiano, ya que eliminó casi totalmente el biofilm afectando significativamente la viabilidad bacteriana (99%) y el biovolumen ($3.866 \mu\text{m}^3$), estos resultados confirman lo reportado por otros autores (Clegg *et al.*, 2006; Del Carpio-Perochena *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2019) donde refieren que el hipoclorito de sodio es el irrigante más eficiente para disolver el biofilm.

Por otra parte, la CHX 2% fue poco efectiva en la eliminación del biofilm, ya que no afectó la viabilidad bacteriana (71%) ni el biovolumen ($330.520 \mu\text{m}^3$), este resultado coincide con la poca capacidad de la CHX 2% para eliminar el biofilm mencionado previamente por (Mohammadi *et al.*, 2009; Del Carpio-Perochena *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012) o de no tener un efecto en el biovolumen de biofilm de *E. faecalis* (Chavez de Paz *et al.*, 2010).

En cuanto a la acción del EDTA, mostró mejor capacidad de eliminar biofilm que la CHX 2% ($p < 0.0001$) afectando considerablemente el biovolumen ($46.852 \mu\text{m}^3$) y la viabilidad (45%), a pesar de que el EDTA se considera como un agente “no antibiótico” y su indicación endodóntica es la remoción de smear-layer post instrumentación, este puede afectar la célula bacteriana mas no matarla (Wang *et al.*, 2013) estos resultados coinciden con estudios donde han demostrado los efectos antimicrobianos del EDTA (Al-Bakri *et al.*, 2009; Gambin *et al.*, 2020).

Con respecto a la capacidad de inhibir la formación de biofilm, el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico inhibió eficazmente el biovolumen, aunque no por completo ($23.345 \mu\text{m}^3$) inhibiendo la agregación bacteriana, de otra parte, con un porcentaje de viabilidad del 84%; se sugiere que no inhibe la colonización bacteriana, ya que le permite al microorganismo adherirse a la superficie dentinal y mantenerse viable. Se puede hipotetizar la inhibición de la agregación bacteriana, teniendo en cuenta las sustancias que componen este compuesto, ya que tanto el ácido sulfúrico como los ácidos sulfónicos pueden desnaturalizar proteínas (EPIEN medical., 2015), esta capacidad pudo afectar el colágeno tipo I del cual está compuesta la dentina (Golberg *et al.*, 2011) tal vez generando cambios estructurales en la misma, impidiendo que adhesinas del *E. faecalis* como la proteína de unión al colágeno (Ace) (Kayaoglu *et al.*, 2008) se unan a este sustrato, impidiendo la adhesión por ende retrasando de alguna forma la colonización e inhibiendo a su vez la agregación bacteriana.

No hay reportes de esta condición en la literatura, por lo cual es un resultado importante para tener en cuenta, ya que este compuesto podría incluirse dentro de los protocolos de irrigación, como un irrigante final en tratamientos donde se necesite evitar una contaminación bacteriana, para ello, es fundamental realizar más estudios que evalúen si este compuesto afecta significativamente la estructura dentinal, ya que este trabajo se observó a través de las imágenes FE-SEM, que este compuesto aparentemente puede afectar la malla colágena al estar en contacto directo con la dentina, este punto es crítico, ya que a nivel clínico puede ser un factor predisponente a la aparición de microfracturas radiculares.

Adicionalmente, el NaOCl 5.25% mostro una inhibición notable del volumen total con un biovolumen promedio de $53.506 \mu\text{m}^3$, sin embargo, no se observó alteración en el patrón de colonización bacteriana, con una viabilidad del 94%; lo cual sugiere que este irrigante pueda tener un efecto sobre la agregación bacteriana. Generalmente, el NaOCl se utiliza como una sustancia para evaluar eliminación, erradicación, disgregación e interrupción de biofilm, no hay modelos reportados de sus efectos inhibitorios *in vitro* en la formación de biofilm, por tal motivo los resultados de este estudio son importantes a este nivel, para tener en cuenta, ya que pueden evidenciar como de alguna manera el NaOCl podría tener un efecto sobre la superficie dentinal que induzca un retraso en la colonización y agregación bacteriana; se podría teorizar teniendo en cuenta su efecto proteolítico que esta sustancia genere cambios importantes a nivel del colágeno que no le permita al *E. faecalis* adherirse adecuadamente al sustrato, o si se lo permite genere uniones lábiles de fácil remoción.

Igualmente, este estudio demostró que la CHX 2%, mostro la mejor capacidad de inhibición de biofilm, inhibiendo el biovolumen ($164.602 \mu\text{m}^3$) y la viabilidad bacteriana (44%), esto puede ser explicado desde el principio de la sustantividad de la CHX, donde la CHX tiene la capacidad de unirse a las superficies que contengan moléculas cargadas negativamente; en el caso de la dentina están moléculas se encontrarían en la hidroxiapatita, desde donde puede seguir liberando su actividad antimicrobiana hasta por 4 semanas (Khademmi *et al.*, 2006), en este trabajo la dentina estuvo en contacto con la CHX por 1 minuto antes de colocar el inóculo, este tiempo pudo permitir que la CHX se adhiriera a la superficie dentinal, por los resultados de inhibición se sugiere que pudo presentarse el principio de sustantividad durante las dos semanas de incubación.

De otra parte, el *E. faecalis* presenta un factor de virulencia que le permite adherirse a la dentina y degradar el colágeno tipo I (Wang *et al.*, 2011), sugiriendo que la acción de esta gelatinasa en la dentina, puede facilitar en esta la liberación de las moléculas de CHX.

Por otra parte, su efecto antimicrobiano se basa en la unión de la molécula catiónica de la CHX a las estructuras aniónicas de la membrana celular, causando una alteración en el equilibrio osmótico de la célula bacteriana (Vianna *et al.*, 2006), esta sería otra explicación del porque en las imágenes del FE-SEM, se observaron tantas alteraciones morfológicas a nivel de la membrana celular bacteriana, ya que ese es el punto diana de la CHX.

El EDTA por su parte no inhibió la formación de biofilm. Esto pudo haber ocurrido, porque en este modelo los cuartos de diente no tenían presencia de smear-layer, ya que este se había sido retirado previamente en la sonicación, por lo cual la acción de este quelante, pudo causar una desmineralización directa, generando una delgada capa de fibrillas de colágeno expuestas y desmineralizadas en la superficie dentinal, creando un sustrato ideal para la adherencia del *E. faecalis*, (Xu *et al.*, 2019), esto coincide con los resultados de este trabajo donde el biovolumen $337.624 \mu\text{m}^3$ y la viabilidad (69%) no se inhibió, antes favoreció la colonización y agregación bacteriana.

11. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó un modelo de biofilm endodóntico *in vitro* de 14 días de formación, sin recambio de medio con *E. faecalis* viable, con un apropiado biovolumen comparado con lo reportado en la literatura y con una estructura tridimensional estable y compatible con un biofilm maduro. Adecuado y reproducible para poder evaluar la eficacia de los irrigantes y/o cualquier otra sustancia antimicrobiana para fines endodónticos.
2. El compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico eliminó el biofilm de manera significativa, pero permite la persistencia de bacterias viables.
3. El compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico inhibió significativamente la formación del biofilm, ya que inhibe considerablemente la agregación bacteriana sobre la superficie dentinal, pero permite la colonización bacteriana.
4. El NaOCl 5.25% eliminó de manera eficaz el biofilm, afectando casi por completo el biovolumen total y la viabilidad bacteriana en un 99%.
5. La CHX 2% presentó una alta capacidad de inhibición del biofilm, disminuyendo significativamente el biovolumen y afectando la viabilidad bacteriana por encima del 50%.
6. Se obtuvo la primera evidencia científica de la eficacia del compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico en la eliminación e inhibición de un biofilm endodóntico mono especie con *E. faecalis*, comparado con los irrigantes comúnmente utilizados en endodoncia.

12. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

En este estudio se utilizó el compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico durante 1 minuto y se puede evidenciar un posible daño estructural a la dentina, por lo cual recomendaría para futuros trabajos evaluar con mejor detalle esta posible alteración con métodos más específicos, para este fin adicionalmente evaluar a 30 segundos y verificar si a ese tiempo, es posible que se puedan tener los mismos resultados a nivel de reducción de biovolumen y viabilidad bacteriana, sin afectar tanto la estructura dentinal. Por otra parte, es muy importante evidenciar a través de más estudios *in vitro*, si el compuesto de ácido sulfónico/sulfúrico genera cambios físicos, químicos, moleculares que afectan considerablemente la estructura dentinal.

Por otra parte, este estudio no tenía como objetivo evaluar la capacidad del compuesto del ácido sulfónico/sulfúrico en la remoción de smear-layer, sería interesante para futuros trabajos contemplar este punto y compáralo con otras sustancias utilizadas en endodoncia para ese fin.

Este trabajo permitirá fortalecer el conocimiento sobre el comportamiento y dinámica de *E. faecalis* sobre su sustrato ideal (dentina) en los conductos radiculares en este sentido, es importante considerar el desarrollo de este modelo, teniendo en cuenta la segunda fase de un tratamiento endodóntico, como lo es la obturación y así se podría evaluar el comportamiento de este microorganismo frente a los cementos selladores y el principal material de obturación que es la gutapercha.

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, este compuesto podría ser utilizado como un irrigante complementario a un protocolo de irrigación, probablemente como irrigante final en casos de alta contaminación bacteriana, donde ayudaría a potencializar la acción descontaminante de otras sustancias irrigadoras. Esta sugerencia se complementa reiterando en la necesidad de más estudios futuros, que generen una garantía de uso clínico, esto frente a los hallazgos encontrados a través del FE-SEM de posible alteración estructural de la dentina durante su uso.

Por último, es importante desde el punto de vista de la fisiología bacteriana evaluar cuales de los factores de virulencia asociados con la formación del biofilm se afectan por el acción del compuesto de ácido sulfónico/ sulfúrico, ya que hay varios estudios que pueden sugerir como los irrigantes convencionales afectan ciertas proteínas asociadas con la formación del biofilm, pero con este compuesto no hay reportes en la literatura, por lo que la evaluación de la expresión de genes asociados a estos factores de virulencia proporcionaría una evidencia importante en este aspecto.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Addy M, Moran JM. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: Chlorhexidine formulations. *Periodontol* 2000.1997;15:52-4.
2. Aguirre J, Bravo C, Ordóñez JA, García de Fernando G. The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. *Advances in Microbiology*, 2012; 2 : 146-161.
3. Ahmed HMA, Hashem AAR. Accessory roots and root canals in human anterior teeth: A review and clinical considerations. *Int Endod J*. 2016; 48, 724-36.
4. Akisue E, Tomita VS, Gavini G, de Figueiredo JAP. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J Endod* 2010; 36:847-850.
5. Al-Bakri AG, Othman G, Bustanji Y. The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin-EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents. *J Appl Microbiol* 2009;107:280-6.
6. Bales PM, Renke EM, May SL, Shen Y, Nelson DC. Purification and characterization of biofilm-associated EPS exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens. *PLoS One*. 2013; 8: e67950.
7. Basrani B R, Manek S, Sodhi R N, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod*. 2007; 33: 966-969.
8. Bitter K, Hambarayan A, Neumann K, Blunck U, Sterzenbach G. Various irrigation protocols for final rinse to improve bond strengths of fiber posts inside the root canal. *European Journal of Oral Sciences*. 2013; 121:349-354.
9. Bramante CM, Duque JA, Cavenago BC, Vivan RR, Bramante AS, de Andrade FB, Duarte MAH. Use of a 660-nm laser to aid in the healing of necrotic alveolar mucosa caused by extruded sodium hypochlorite: A case report. *J Endod*. 2015; 41: 1899-1902.
10. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria. *J Endod*. 2010; 36:70-7
11. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. 2006. *J Endod*; 32 : 434-437.
12. Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MAH, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, ... Ordinola-Zapata R. Biofilm Dissolution and Cleaning Ability of Different Irrigant Solutions on Intraorally Infected Dentin. *J Endod*. 2011; 37: 1134-1138.
13. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002; 28: 689-693.

14. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod. 2006; 32:27-31.
15. Du T, Wang Z, Shen Y, et al. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. J Endod. 2014; 40: 509-14.
16. Endo MS, Signoretti FG, Kitayama VS, et al. Culture and molecular detection of from patients with failure endodontic treatment and antimicrobial susceptibility of clinical isolates *Enterococcus faecalis*. Braz Dent Sci. 2014; 17:83-91.
17. Fan W, Wu D, Tay FR, Ma T, Wu Y, Fan B. Effects of adsorbed and templated nanosilver in mesoporous calcium-silicate nanoparticles on inhibition of bacteria colonization of dentin. Int J Nanomedicine. 2014; 9:5217-5230.
18. Farook SA, Shah V, Lenouvel D, Sheikh O, Sadiq Z, Cascarini L, Webb R. Guidelines for management of sodium hypochlorite extrusion injuries. Br Dent J. 2014; 217:679-84.
19. Fiorillo L. Chlorhexidine Gel Use in the Oral District: A Systematic Review. Gels. 2019; 11:1-31.
20. Frough-Reyhani.M, Ghasemi.N, Soroush-Barhaghi. M, Amini M, Gholizadeh.Y. Antimicrobial efficacy of different concentration of sodium hypochlorite on the biofilm of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. J Clin Exp Dent. 2016; 8: 480-4.
21. Fux C, Costerton J, Stewart P, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol. 2005; 13: 34–40.
22. Gambin DJ, Leal LO, Farina AP, Souza MA, Cecchin D. Antimicrobial activity of glycolic acid as a final irrigant solution for root canal preparation. Gen Dent. 2020; 68:41-44.
23. George S, Kishen A, Song P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2005; 31:867-72.
24. Ghorbanzadeh A, Bahador A, Sarraf P, Ayar R, Fekrazad R, Asefi S. Ex Vivo Comparison of Antibacterial Efficacy of Conventional Chemomechanical Debridement Alone and in Combination with Light-Activated Disinfection and Laser Irradiation Against *Enterococcus Faecalis* Biofilm. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2020; 29: 101648.
25. Goldberg M, Kulkarni A, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization. Front Biosci (Elite Ed). 2011; 3:711-35.
26. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19:71-6.
27. Gomes BP. Rôças IN, Siqueira Junior JF. Endodontic infections and therapeutical approaches. In: Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF, Koo H, editors. Oral Microbiology and Immunology. 2014. 3rd ed. Washington (DC): chapter 18.
28. Gomes B, Vianna M, Zaia A, Almeida J, Souza F, Ferraz R. Chlorhexidine in endodontics review article. Brazilian Dental Journal. 2013; 24: 89-102.

29. Guerreiro-Tanomaru JM, De Faria-Júnior NB, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Graeff MSZ, Tanomaru-Filho M. Comparative Analysis of *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation on Different Substrates. J Endod. 2013; 39: 346-350.
30. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res. 1987; 66:1375-9.
31. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. Dent Clin North Am. 2010; 54:291-312.
32. Haragushiku GA, Back ED, Tomazinho PH, Baratto Filho F, Furuse AY. Influence of antimicrobial solutions in the decontamination and adhesion of glass-fiber posts to root canals. Journal of Applied Oral Science. 2015; 23:436-441.
33. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay F. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. Journal of Dental Research. 2005; 84: 741-746.
34. EPIEN Inc. 2015. <http://www.epien.com/products/>
35. Jhajharia K, Parolia A, Shetty V, Mehta L. Biofilm in endodontics: A review. Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry. 2015; 5:1-12.
36. Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. J Conserv Dent. 2010; 13:256-64.
37. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15:308-20.
38. Kayaoglu G, Erten H, Ørstavik D. Possible role of the adhesin ace and collagen adherence in conveying resistance to disinfectants on *Enterococcus faecalis*. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23:449-54.
39. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. Aust Endod J, 2006; 32: 12115.
40. Kishen A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. Endodontic Topics. 2012; 22: 99-123.
41. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. Vaccine 2004; 22: 822–830.
42. Kokkas AB, Boutsoukis A, Vassiliadis LP, Stavrianos CK. The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an *in vitro* study. J Endod. 2004; 30:100–2.
43. Liu H, Wei X, Ling j, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. J Endod. 2010; 36:630-635.
44. Louwakul P, Saelo A, Khemaleelakul S. Efficacy of calcium oxide and calcium hydroxide nanoparticles on the elimination of *Enterococcus faecalis* in human root dentin. Clinical Oral Investigations. 2016; 21: 865–871.

45. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011; 37: 1380–1385.
46. Marshall GW, Yucel N, Balooch M. Sodium hypochlorite alterations of dentin and dentin collagen. *Surf Sci*, 2001; 491:444-455.
47. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*. 2009; 42:288-302.
48. Mohammadi Z, Jafarzadeh H, Shalavi S. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine as a root canal irrigant: a literature review. *Journal of Oral Science*. 2014; 56:99-103
49. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod*, 2004; 30:785-787.
50. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15:348-81
51. Niazi SA, Clark D, Do T, Gilbert SC, Foschi F, Mannocci F, Beighton D. The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. *Int Endod J*. 2014; 47:756-68.
52. Pérez AR, Alves FRF, Marceliano-Alves MF, Provenzano JC, Gonçalves LS, Neves AA, Siqueira Junior JF. Effects of increased apical enlargement on the amount of unprepared areas and coronal dentin removal: a micro-computed tomography study. *Int Endod J*. 2018; 51:684-90.
53. Pillar C, Gilmore MS. Enterococcal virulence - pathogenicity island of *E. Faecalis*. *Frontiers in Bioscience*, 2004; 9: 2335-2346.
54. Qian W, Shen Y, Haapasalo M. Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *J Endod*. 2011; 37: 1437–1441.
55. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*. 2015; 7:493-512.
56. Rodrigues CT, De Andrade FB, De Vasconcelos LRS M, Midená RZ, Pereira TC, Kuga MC, ... Bernardineli N. Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm and infected dentinal tubules. *Int Endod J*. 2018; 51: 901-911.
57. Rohrer MD, Prasad HS, Savord EG. A histologic assessment of a HYBENX® oral tissue decontaminant in vital pulp therapy in dogs. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2016; 30:189-97.
58. Sahni K, Khashai F, Forghany A, Krasieva T, Wilder-Smith. Exploring mechanisms of biofilm removal. *Dentistry (Sunnyvale)*. 2016; 6: 371.
59. Sauro S, Mannocci F, Tay FR, et al. Deproteinization effects of NaOCl on acid-etched dentin in clinically-relevant vs prolonged periods of application. A confocal and environmental scanning electron microscopy study. *Oper Dent*. 2009; 34:166-173.

60. Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20:10-9.
61. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod*. 2006; 32: 104-109.
62. Siqueira JF, Rôças I. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97:85-94.
63. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2—Redefining the endodontic microbiota. *J Endod*. 2005a; 31: 488-98.
64. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008; 34:1291-1301.
65. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol* 2009; 1:1-12.
66. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009; 88: 969–81.
67. Siqueira Jr JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res*. 2018; 18;32(suppl 1):e65. Review.
68. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod*. 2005; 31:669 - 671.
69. Soares Já, Roque de Carvalho MA, De Macedo Farias L. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*. 2010; 36: 894-898.
70. Stewart P. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol*. 2002; 292:107-113.
71. Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J* 2012; 45: 363-371.
72. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006; 32:93-98.
73. Sun J, Song X. Assessment of Antimicrobial Susceptibility of *Enterococcus Faecalis* Isolated From Chronic Periodontitis in Biofilm Versus Planktonic Phase. *J Periodontol*. 2011; 82:626.
74. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J*. 2019; 52:604-628.

75. Taglialegna A, Matilla-Cuenca L, Dorado-Morales P, Navarro S, Ventura S, Garnett J, Lasa I, Valle J. The biofilm-associated surface protein Esp of *Enterococcus faecalis* forms amyloid-like fibers. NPJ Biofilms Microbiomes. 2020; 6: 15.
76. Tay C, Quah S, Lui J, Yu V, Tan, K. Matrix metalloproteinase inhibitor as an antimicrobial agent to eradicate *Enterococcus faecalis* biofilm. J. Endod. 2015; 41:858-863.
77. Thomas AR, Mani R, Reddy TV, Ravichandran A, Sivakumar M, Krishnakumar S. Evaluation of the Antibacterial Efficiency of a Combination of 1% Alexidine and Sodium Hypochlorite on *Enterococcus faecalis* Biofilm Models: An *In Vitro* Study. J Contemp Dent Pract. 2019; 20:1090-1094.
78. VanTyne D, Gilmore M.S. Friend turned foe: Evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. Annu.Rev.Microbiol. 2014; 68:337-356.
79. Versiani MA, Pecora JD, de Sousa-Neto MD. Root and root canal morphology of four-rooted maxillary second molars: a micro-computed tomography study. J Endod. 2012; 38, 977-82.
80. Versiani MA, Ordinola-Zapata R, Keles A et al. Middle mesial canals in mandibular first molars: A micro-CT study in different populations. Archives of Oral Biology. 2016; 61, 130-7.
81. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. Int Endod J. 2006; 39:484-492.
82. Wang L, Dong M, Zheng J. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. J Endod 2011; 37:631-636.
83. 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.
84. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of Smear Layer against Disinfection Protocols on *Enterococcus faecalis* infected Dentin. J Endod. 2013; 39: 1395-1400.
85. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2009; 35:95-97.
86. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. J Endod. 2014; 40:285-290.
87. Xu J, He J, Shen Y, Zhou X, Huang D, Gao Y, Haapasalo M. Influence of Endodontic Procedure on the Adherence of *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2019; 45:943-949.
88. Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J, Haapasalo M. Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions. J Endod. 2016; 42: 1246-1250.

89. Yap B, Zilm PS, Briggs N, Rogers AH, Cathro PC. The effect of sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* when grown on dentine as a single- and multi-species biofilm. Australian Endodontic Journal. 2014; 40: 101-110.
90. Ye WH, Fan B, Purcell W, Meghil MM, Cutler CW, Bergeron BE, Ma JZ, Tay FR, Niu LN. Anti-biofilm efficacy of root canal irrigants against *in-situ* *Enterococcus faecalis* biofilms in root canals, isthmuses and dentinal tubules. J Dent. 2018; 79: 68-76.
91. Zamany A, Safavi K, Spångberg LSW. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 96: 578-581.
92. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod. 2005; 31:817–820.79:68-76.
93. Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006; 32:389-398.