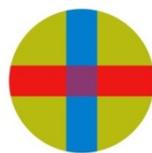


**Universidad CEU SAN PABLO MADRID**  
**CEINDO-CEU Escuela Internacional Doctorado**

**Programa Odontología Experimental y Clínica**



**CEU**  
*Universidad  
San Pablo*

**"Eficacia de los quelantes Ácido  
Etilendiaminotetracético (EDTA) y Ácido  
Etidrónico (HEDP) en la eliminación del biofilm  
maduro de Enterococcus faecalis mediante  
activación ultrasónica pasiva (PUI) y limas XP-  
Endo finisher XPF".**

Tesis Doctoral

Presentada por Alejandro Álvarez Sagüés para optar al grado de  
Doctor

Dirigida por:

Dra. Magdalena Azabal Arroyo

Dr. Estanislao Nistal-Villán

MADRID 2021

Tesis Doctoral

**Alejandro Álvarez Sagüés**

2021

Cuando crees saber todas las respuestas,  
la vida te cambia todas las preguntas.

## **Agradecimientos**

Aprovecho esta maravillosa oportunidad para agradecer a todas las personas que me han ayudado a realizar esta Tesis Doctoral, ya que sin ellas no habría sido posible.

GRACIAS, en primer lugar, a mis directores la Dra. Magdalena Azabal Arroyo y a Estanislao Nistal-Villán. A Magdalena, por hacerme descubrir, ya durante la carrera, esta especialidad tan bonita que es la Endodoncia, por confiar en mí y ayudarme a embarcarme en este proyecto y por contribuir a convertirme en el endodoncista que soy hoy. A Estanis, por enseñarme el gusto por la investigación, los valores que hay detrás y hacerme aprender que, con el trabajo duro, las cosas que parecen imposibles llegan a salir, gracias por tus horas de trabajo y por estar siempre disponible para ayudar.

GRACIAS a Jesús Presa por sus horas de laboratorio y su vitalidad que han sido un punto de apoyo en toda la metodología de esta Tesis Doctoral y a Laura Álvarez por sus consejos y ayuda.

GRACIAS a todo el personal de Farmacia de la Universidad San Pablo CEU que nos ha enseñado y facilitado todo el material y los laboratorios. A Bryan, por sus traducciones y correcciones con el idioma.

Personalmente quiero dar las GRACIAS a varias personas sin las cuales este proyecto no hubiera salido adelante. En primer lugar, GRACIAS a mis padres; Jano, mi padre, por ser mi referente en la vida, mi mejor amigo y que me ayudas a ser mejor cada día, y a Cani, mi madre, porque siempre estás ahí ayudándome en todo momento y porque la palabra familia empieza contigo.

GRACIAS a mi novia, Ale, porque me das todo, me has ayudado en este largo camino en mis puntos más bajos durante esta tesis, me has levantado haciendo que llegue hoy aquí y haciéndolo posible.

Y GRACIAS, a todos aquellos que me han acompañado en este largo viaje. A las clínicas donde trabajo por ayudarme en la recolección de muestras, radiografías y dejarme siempre disponible tanto la clínica como el tiempo para realizar este trabajo. A Carlos Martín, un gran amigo, por sus clases particulares de química en la distancia, su amistad y apoyo, y por último a esos amigos que siempre me animaron a seguir en este camino, que, por suerte, sois muchos.



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>Generalidades</b>	<b>10</b>
Sistemas rotatorios	11
Lima de terminación XP-Endo finisher	12
<b>Irrigación</b>	<b>14</b>
Generalidades	14
Hipoclorito de sodio	15
<i>Reacciones químicas del hipoclorito de sodio</i>	16
Barrillo dentinario ( <i>smear layer</i> )	21
Quelantes	22
<i>Medios de quelantes</i>	24
<i>Quelantes fuertes y débiles</i>	25
<i>Etilendiaminotetracético (EDTA)</i>	25
<i>Ácido Etidróico</i>	29
<i>Tiempo de trabajo de los quelantes</i>	30
<i>Quelación continua</i>	31
<b>Técnicas de irrigación</b>	<b>32</b>
Activación sónica y ultrasónica	34
<i>Conceptos de microcorriente acústica y cavitación</i>	35
<b>Bacterias</b>	<b>38</b>
Generalidades	38
Película dental y colonización bacteriana	39
Hipótesis de la placa no específica y específica	40
Hipótesis de la placa ecológica	41
Biofilm	42
<i>Formación del biofilm</i>	43
<i>Comunicación dentro del biofilm</i>	44
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>51</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
Objetivo general	55
Objetivos específicos	55
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>56</b>
Selección de dientes y preparación de raíces	57

Individualización de muestras _____	59
Preparación de Biofilm e inoculación _____	60
Selección de grupos y aplicación de tratamiento _____	63
Obtención y recogida de muestras _____	64
Análisis estadístico _____	66
<b>RESULTADOS</b> _____	<b>67</b>
Resultados del primer grupo, EDTA _____	69
Resultados del segundo grupo, EDTA y NaOCl al 5,25% _____	72
Resultados del tercer grupo, HEDP y NaOCl al 5,25% _____	75
Resultados del cuarto grupo PBS _____	78
<b>DISCUSIÓN</b> _____	<b>83</b>
Discusión del material y método _____	84
Discusión sobre la elección de los irrigantes _____	85
Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) _____	85
Ácido etidróico _____	86
Discusión sobre las técnicas de activación de la irrigación _____	88
Discusión sobre el biofilm de <i>Enterococcus faecalis</i> _____	91
Discusión de los resultados _____	92
Discusión sobre la eficacia del EDTA _____	92
Discusión sobre el EDTA e hipoclorito de sodio al 5,25% _____	96
Discusión del ácido etidróico _____	98
Discusión sobre activación ultrasónica pasiva (PUI) y Endo XP finisher (XPF) _____	101
<b>CONCLUSIONES</b> _____	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> _____	<b>107</b>
<b>ANEXO I</b> _____	<b>126</b>
<b>ANEXO II</b> _____	<b>129</b>
Publicación en <i>Dentistry Journal</i> _____	130
Álvarez-Sagüés A, Herce N, Amador U, Llinares-Pinel F, Nistal-Villán E, Presa J, Álvarez L, Azabal M. Efficacy of EDTA and HEDP Chelators in the Removal of Mature Biofilm of <i>Enterococcus faecalis</i> by PUI and XPF File activation. <i>Dent J (Basel)</i> .2021.Apr 9;9(4):41. _____	130

# **RESUMEN**

**Introducción:** Las bacterias que causan infecciones en endodoncia se agrupan y asocian entre ellas formando una estructura denominada biofilm. La eliminación del biofilm de las superficies de los conductos radiculares es la principal estrategia para evitar que se produzcan o persistan dichas infecciones. En endodoncia, el uso de limas junto con irrigantes solubles durante la biomecánica es fundamental para mejorar la desinfección de los conductos radiculares. La irrigación es trascendental para poder acceder a todas estas superficies que con la biomecánica no se puede acceder. Con la irrigación conseguimos la disolución y eliminación de la materia orgánica (pulpa, bacterias) e inorgánica (barrillo dentinario) del interior del sistema de conductos. En la actualidad no existe un único irrigante que combine la capacidad de disolver tejido orgánico e inorgánico.

**Objetivos:** La eliminación del biofilm del conducto radicular durante el tratamiento endodóntico es necesaria para evitar reinfecciones posteriores. El uso de limas dentales combinadas con irrigantes durante la instrumentación es fundamental para garantizar una limpieza y desinfección perfectas. Se han propuesto varios irrigantes sin una comparación adecuada. El objetivo de este estudio es comparar diferentes enfoques para limpiar el conducto radicular utilizando la activación ultrasónica pasiva (PUI) o limas de activación XP-Endo finisher (XPF) en combinación con irrigantes como ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido etidróico (HEDP) combinado con hipoclorito de sodio (NaOCl) 5,25% o EDTA combinado con NaOCl 5,25%.

**Material y método:** Se recogieron 100 dientes, unirradiculares y multirradiculares, y se amputaron sus raíces. Tras la preparación mecánica del conducto con el sistema de lima rotatoria WaveOne Gold de Denstply, se incubaron en Eppendorf con 0,5 McFarland (McF) de *Enterococcus faecalis* en 1mL de *brain heart infusion* (BHI) y se incubaron durante 2 semanas a 37°C. Posteriormente, las raíces se dividieron en 5 grupos (n=20) según el tipo de irrigante utilizado. EDTA 17%, HEDP combinado con NaOCl 5,25%, EDTA 17% mezclado con NaOCl 5,25%, un irrigante neutro (PBS) y un grupo control. Cada grupo de irrigantes se dividió según la técnica de activación empleada en dos subgrupos (n=10): PUI y XPF. El material de dentina recuperado de los conductos radiculares se utilizó para cuantificar las bacterias restantes.

**Resultados:** El grupo irrigado con EDTA tuvo un efecto significativo en la reducción de las bacterias. El EDTA mezclado con NaOCl presentó una reducción que el EDTA solo. Finalmente, el HEDP preparado en NaOCl fue el irrigante más eficaz, ya que no se recuperaron bacterias con este tratamiento.

**Conclusiones:** El HEDP es el mejor agente de irrigación activado con XPF o PUI para eliminar las bacterias en nuestro modelo experimental de biofilm.

**Palabras clave:** *Enterococcus faecalis*, EDTA, HEDP, activación ultrasónica pasiva (PUI), lima Endo-XP (XPF).

# **ABSTRACT**

**Introduction:** Bacteria causing infections in endodontics are grouped together forming a structure called biofilm. Biofilm removal from root canal surfaces is the main strategy to prevent such infections from developing or persisting. In endodontics, the use of files together with soluble irrigants during biomechanics is fundamental to improve root canal disinfection. Irrigation is transcendental to be able to access all these surfaces that we cannot access with biomechanics. With irrigation we achieve the dissolution and elimination of organic matter (pulp, bacteria) and inorganic matter (smear layer) from inside the canal system. There is currently no single irrigant that combines the ability to dissolve organic and inorganic tissue.

**Objectives:** Biofilm removal from root canal during endodontic treatment is necessary to prevent further complications. The use of dental files combined with irrigants during instrumentation is fundamental to ensure perfect cleaning and disinfection. Several irrigants have been proposed without a proper comparison. The aim of this study is to compare different state of the art approaches to clean the root canal using passive ultrasonic activation (PUI) or XP-Endo finisher (XPF) file activation in combination with irrigants such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), etidronic acid (HEDP) combined with sodium hypochlorite (NaOCl) 5.25% or EDTA combined with NaOCl 5.25%.

**Material and Method:** 100 teeth, uniradicular and multiradicular, were collected and their roots were amputated. After mechanical preparation of the canal with the Denstply WaveOne Gold rotary file system, they were incubated in Eppendorf with 0.5 McFarland (McF) of *Enterococcus faecalis* in 1mL of brain heart infusion (BHI) and incubated for 2 weeks at 37°C. Subsequently, roots were divided into 5 groups (n=20) according to the type of irrigant used. EDTA 17%, HEDP combined with NaOCl 5.25%, EDTA 17% mixed with NaOCl 5.25%, a neutral irrigant (PBS) and a control group. Each irrigant group was divided according to the activation technique used into two subgroups (n=10): PUI and XPF. Dentin material recovered from root canals was used to quantify the residual bacteria.

**Results:** The EDTA irrigated group had a significant effect on bacterial reduction. EDTA mixed with NaOCl presented a reduction than EDTA alone. Finally, HEDP prepared in NaOCl was the most effective irrigant, as no bacteria were recovered with this treatment.

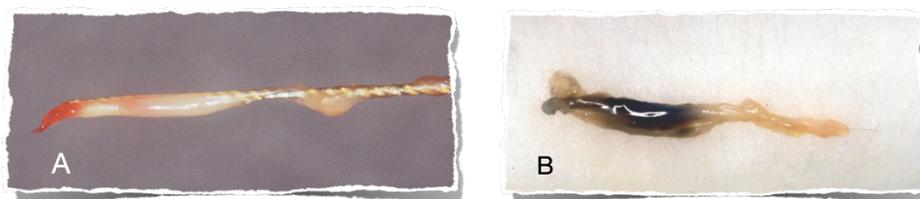
**Conclusions:** HEDP is the best irrigant activated with XPF or PUI to eliminate bacteria in our experimental biofilm model.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, EDTA, HEDP, Passive Ultrasonic Activation (PUI), Endo-XP finisher (XPF).

# **INTRODUCCIÓN**

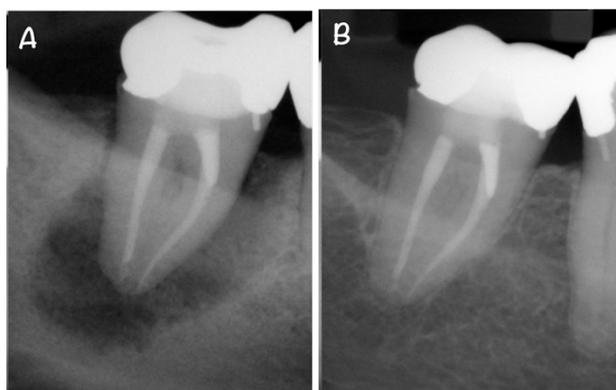
## Generalidades

La endodoncia es un tratamiento odontológico que busca conocer y tratar las alteraciones relacionadas con la agresión del tejido pulpar. **(Figura 1)** Estas agresiones pueden tener un origen inflamatorio (trauma), infeccioso (caries) o combinado. Según como estas agresiones afecten al sistema pulpar pueden hacerlo de manera reversible o irreversible, llegando a una necrosis pulpar, si se prolongase en el tiempo. Por último, este tipo de lesiones no siempre muestran clínica y sintomatología ya que muchas veces cursan de manera asintomática.



**Figura 1.** (A) Fotografía de tejido pulpar vital extraído durante una endodoncia en un 3.6 por pulpitis irreversible. (B) Fotografía de tejido pulpar necrótico extraído durante la endodoncia de un 1.6 donde se aprecia la falta de riego sanguíneo producido por la muerte del tejido pulpar.

El objetivo de la endodoncia es eliminar el agente causante de la alteración pulpar. Esto se consigue con la limpieza y desinfección de los de conductos radiculares. Mediante, por un lado, la instrumentación mecánica (limas) y por otro lado con elementos químicos (irrigación) **(Figura 2)**.



**Figura 2.** (A) Radiografía periapical de diagnóstico de un 1.4 donde se puede ver una necrosis con lesión apical, provocada por una obturación profunda realizada hace un año. (B) Radiografía periapical de revisión del 1.4 pasados 3 meses donde podemos observar el tratamiento de conductos realizado y la curación de la lesión apical.

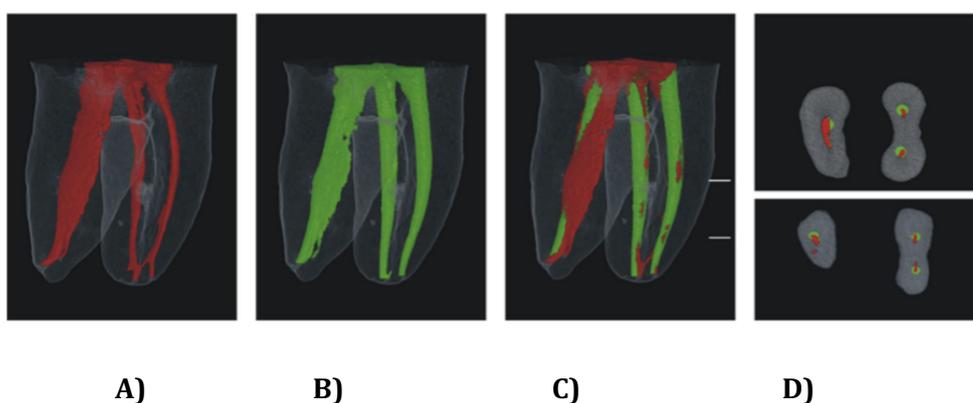
## Sistemas rotatorios

La instrumentación mecánica ha ido evolucionando a lo largo de los años. La incorporación de la instrumentación rotatoria (**Figura 3**) y la aleación níquel titanio han ayudado a la instrumentación clásica manual para mejorar los tratamientos. Esto, sumado a nuevos conceptos de instrumentación, como la instrumentación recíprocante, ha facilitado una mejor limpieza y conformación de los conductos disminuyendo los errores durante la preparación (1, 2).



**Figura 3.** Fotografía de motor de endodoncia y un sistema rotatorio recíprocante. Lima Waveone Gold primary 25/07.

A pesar de las mejoras en la instrumentación mecánica, se ha comprobado que los sistemas de limas rotatorias principales, no llegan a contactar con todas superficies de los conductos radiculares, esto puede ocasionar que queden zonas sin tratar y pueda ocurrir un posible fracaso endodóntico (3) (**Figura 4**).



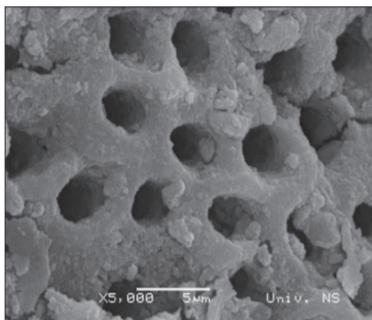
**Figura 4.** Imágenes de  $\mu$ CT de un molar inferior tomadas de Zhao y cols (3, 4). (A) Anatomía original del molar inferior (color rojo). (B) Instrumentación del sistema de conductos radiculares con WaveOne Gold Primary (color verde). (C y D) Superposición de áreas instrumentadas (color verde) y no instrumentadas (color rojo) donde se observan zonas sin tratar, sobre todo en los conductos distales.

## Lima de terminación XP-Endo finisher

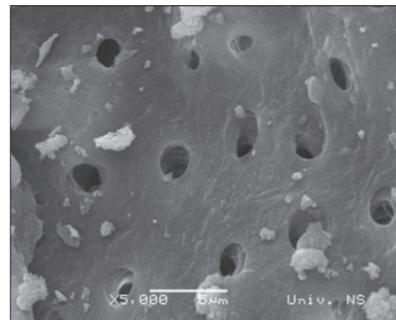
Para evitar que queden zonas sin tratar, se ha desarrollado instrumental complementario que ayuda a mejorar el contacto de superficies no tratadas. Entre ellas están la lima de terminación, XP-Endo finisher (XPF) (3) (**Figura 5**). Se conoce como lima de terminación porque se emplea después de la preparación biomecánica del conducto en el protocolo de irrigación final, para ayudar al irrigante a acceder a más superficies. Esta lima funciona a una mayor velocidad (800 rpm) con un calibre menor, que puede variar dependiendo de la temperatura a la que se utilice, 0.01 a 0.04 (si llegamos a 35 grados) (3, 5). Presenta una gran flexibilidad para poder moverse bien dentro de los conductos con un movimiento cíclico oscilante (5). Gracias a esto, puede remover los restos de dentina y material inorgánico generados durante la instrumentación, conocidos como barrillo dentinario, concepto que se verá más adelante y permitir un mayor acceso a los túbulos dentinarios para penetrar mejor con la irrigación (**Figura 6**).



**Figura 5.** Fotografía de la Lima XP-Endo finisher (XPF), con su movimiento cíclico oscilante.



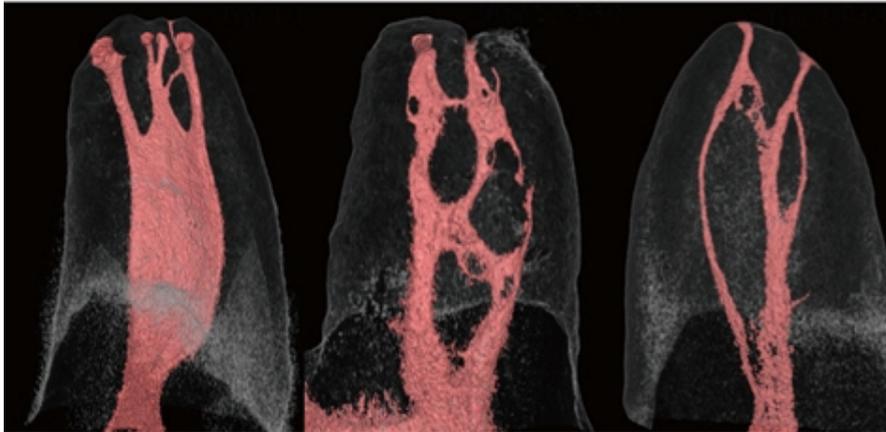
**A)**



**B)**

**Figura 6.** Imágenes con microscopía SEM, la imagen (A) corresponde a las paredes del conducto radicular después de la instrumentación mecánica, donde se aprecia el barrillo dentinario generado y la imagen (B) después de haber usado la XPF para limpiarlo (6).

Aunque se use esta lima complementaria, sigue habiendo zonas de las paredes donde no se puede llegar a contactar con el instrumental mecánico. Esto se debe a que el conducto radicular se estructura como un sistema de conductos y su distribución es mucho más compleja que un único canal radicular. La presencia de conductos laterales, istmos y deltas apicales (**Figura 7**) imposibilitan la llegada del instrumental mecánico a esas superficies (7).



**Figura 7.** Reconstrucción de imágenes de 3 tercios apicales en 3 premolares inferiores que nos define la complejidad del sistema de conductos, con distintos deltas uniones ramificaciones e istmos. Fischer GM, Evans CE. (7).

Debido a esta complejidad, se hace obligatorio el uso de la irrigación, gracias a ella se podrá acceder y desinfectar estas zonas tan complicadas de contactar. La irrigación debe permitir la disolución y eliminación de la materia orgánica como el tejido pulpar y microorganismos e inorgánica como el barrillo dentinario del interior de los conductos radiculares (8, 9) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Irrigación con Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5,25% en un 3.7.

# Irrigación

## Generalidades

La instrumentación, como se ha comentado, necesita de la ayuda de la irrigación para eliminar y desinfectar la mayor parte de las superficies del sistema de conductos radiculares (9, 10).

El irrigante que se vaya a utilizar, deseamos que tenga buenas propiedades, tales como capacidad de disolver los tejidos pulpares, tanto en diente vital como en diente necrótico, no solo de los conductos principales sino también de las superficies de difícil acceso, deltas, itsmos, ramificaciones o conductos accesorios (11). Debe presentar una baja tensión superficial para facilitar el flujo por las superficies de las paredes dentinarias (12) y debe tener baja toxicidad para los tejidos perirradiculares (11, 13). Que nos facilite la entrada del instrumental, con lubricación para poder llegar mejor a la región apical y tener una buena capacidad antimicrobiana para que pueda destruir el biofilm y las sustancias residuales que puedan quedar después de la instrumentación, como el barrillo dentinario (14) (**Figura 9**).

Características irrigante ideal	
1. Tener capacidad antimicrobiana.	9. No tener efectos adversos.
2. No irritar los tejidos periapicales.	10. No afectar a la obturación.
3. Ser una solución estable y activa.	11. No teñir el diente.
4. Tener un efecto prolongado en el tiempo.	12. Ser biocompatible.
5. Poseer una baja tensión superficial.	13. Favorecer la curación.
6. Disolver materia orgánica.	14. No presentar toxicidad.
7. Eliminar materia inorgánica.	15. Poseer un manejo fácil.
8. Ser lubricante.	16. Tener un coste económico.

**Figura 9.** Tabla de las condiciones ideales de un irrigante (11-13).

Actualmente no existe el irrigante ideal que cumpla con todas y cada una de estas propiedades, tenemos, por tanto, que combinar diferentes irrigantes para poder lograr todos estos efectos.

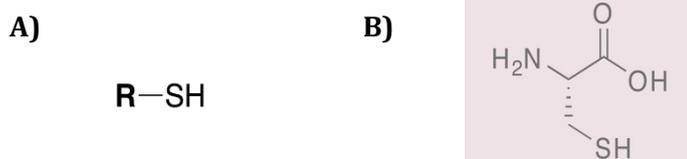
El irrigante principal y más usado en endodoncia es el hipoclorito de sodio (NaOCl). Se ha usado a lo largo de los años a diferentes concentraciones, diferentes tiempos y temperatura, sin haber un consenso claro (15). Este irrigante a lo largo de los años se ha empleado solo o bien acompañado de otros irrigantes con el objetivo de mejorar su actividad.

## **Hipoclorito de sodio**

El motivo principal del uso del hipoclorito de sodio (NaOCl) en endodoncia se debe a su capacidad para la disolución del tejido orgánico, como el tejido pulpar, y por su poder antimicrobiano (15).

El compuesto activo del NaOCl es el cloro libre. El cloro, fue descubierto en el Siglo XIII y se preparó en su forma pura ( $\text{Cl}_2$ ) por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele en 1774. Las propiedades que descubrió Scheele del cloro (Cl) son su solubilidad en el agua y su reacción con metales y óxidos de metales. El nombre Cloro se basó en la palabra griega 'chloros', que hace referencia a un color amarillo-verdoso que representa el color del Cloro gas (16).

El cloro presente en el hipoclorito de sodio actúa contra las bacterias rompiendo las uniones químicas moleculares. Es un fuerte oxidante, lo que provoca la inhibición de las enzimas bacterianas en un proceso llamado oxidación irreversible de los grupos sulfhidrilos o grupos tiol (-SH). Están compuestos por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno (-SH). Es el grupo funcional del aminoácido cisteína y desempeña un papel importante en los sistemas biológicos de las enzimas bacterianas esenciales (**Figura 10**). La forma en la que el cloro interacciona con este grupo ocurre al intercambiar átomos con las enzimas y células bacterianas. Cuando las enzimas entran en contacto con el cloro, uno o más de los átomos de hidrógeno son sustituidos por el cloro, lo que provoca que la molécula se transforme o se rompa. Si la enzima no funciona correctamente, puede causar la muerte de las células bacterianas o incluso de la propia bacteria (16-18).



**Figura 10.** **A)** Esquema del grupo sulfhidrilo o grupo tiol, compuesto por una molécula de azufre (S) y de hidrógeno (H) asociado a un radical (R). **B)** Esquema de la cisteína con el grupo sulfhidrilo que es su grupo funcional.

A continuación, se explican, de manera más detallada, cómo surgen las diferentes reacciones químicas que dan lugar al poder de disolución y antimicrobiano del hipoclorito de sodio (NaOCl).

### ***Reacciones químicas del hipoclorito de sodio***

Para entender el hipoclorito de sodio hay que fijarse en su fórmula química. El hipoclorito de sodio es una sal que se compone de un catión o ión positivo y un ión o anión negativo. El anión o parte negativa hace referencia a la parte de hipoclorito, que se compone a su vez de un átomo de cloro y un átomo de oxígeno ( $ClO^-$ ) y la parte positiva o catión es  $Na^+$ , por lo tanto, la unión del anión con el catión forma el hipoclorito de sodio (NaOCl).

Pécora y cols (18) informaron de que el hipoclorito de sodio (NaOCl) presenta un equilibrio dinámico, como lo demuestra la siguiente reacción, que tiende a cambiar de dirección continuamente dependiendo del pH. En forma ácida (pH menor que 4) predomina el cloro gas  $Cl_2$ . En condición neutra (pH 7) el ácido hipocloroso (HOCl) y en pH alcalinos mayores de 9 el ión hipoclorito ( $ClO^-$ ). La forma en que se produce el cloro es mediante oxidación química y electrolítica (18, 19).



El hipoclorito de sodio (NaOCl) en solución acusa da lugar a hidróxido de sodio (NaOH) y ácido hipocloroso (HOCl). Posteriormente dependiendo del pH se disocia

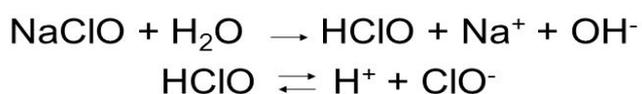
en iones de sodio  $\text{Na}^+$  y en iones hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ), o bien predominado el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) si la solución tiene pH ácido (18, 19).

Esta sustancia iónica se disocia de la siguiente manera:  $\text{Na}^{(+)} \text{OCl}^{(-)}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  nos da como resultado  $\text{ClO}^-$  (ÁCIDO) +  $\text{Na}^+$  (BASE) a su vez el  $\text{ClO}^-$  proviene del ácido hipocloroso  $\text{HClO}$  y el  $\text{Na}^+$  proviene de la base  $\text{NaOH}$ .

Al juntar el  $\text{Na}^+ + \text{H}_2\text{O}$  no se produce reacción al no tener fuerza para combinarse el  $\text{Na}^{(+)}$  al grupo hidroxilo del agua. ( $\text{OH}$ ).

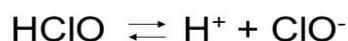
Al juntar el  $\text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O}$ , si existe fuerza de unión, reaccionando el ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) y un grupo Hidroxilo ( $\text{OH}$ ).

Al sumar todas las reacciones tenemos:  $\text{NaOCl}$  en agua  $\text{HClO} + \text{Na} + \text{OH}$ .



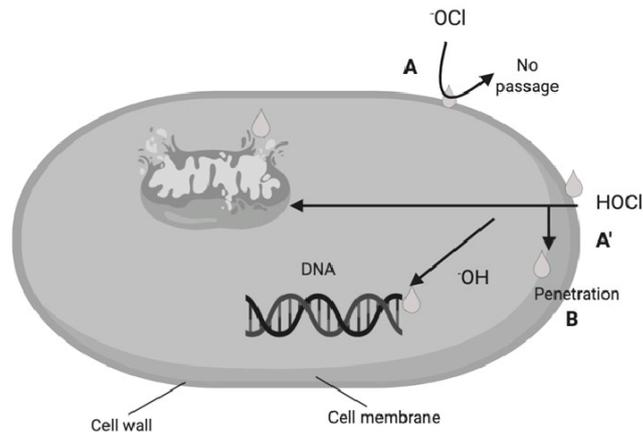
Esta primera reacción aumenta el pH. El ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), es eléctricamente neutral y los iones hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) eléctricamente negativos, esto es lo que provoca la desinfección, que se explicará más adelante (18, 19).

Ambas sustancias tienen un comportamiento muy distintivo. El ácido hipocloroso es un agente más reactivo y fuerte que el hipoclorito. El ácido hipocloroso se divide en ión hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) e hidrógeno ( $\text{H}$ ) (18-20).



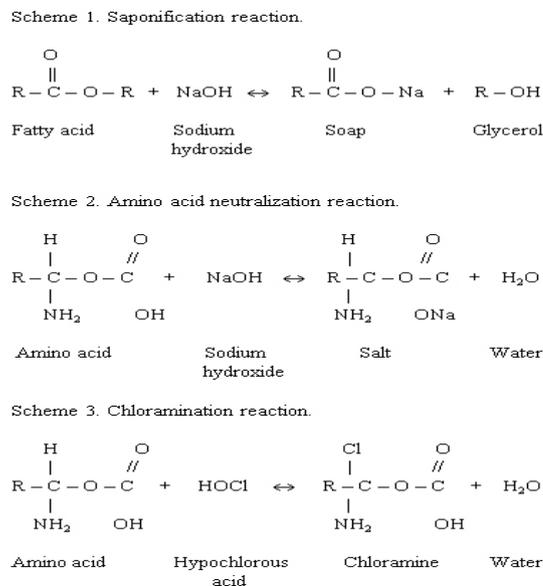
La pared celular de los microorganismos patógenos está cargada negativamente, de esta manera puede ser penetrado por el ácido hipocloroso neutro, en lugar del ión hipoclorito cargado negativamente (18, 19). El ácido hipocloroso puede penetrar en las paredes celulares y capas protectoras de microorganismos influyendo de manera efectiva contra los patógenos, o bien mueren o su actividad

reproductiva se ve inhibida, como hemos comentado anteriormente gracias a la acción del cloro (18, 19) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Esquema de la penetración del ácido hipocloroso dentro de la bacteria para su posterior inhibición (18). Se puede observar como el ión hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) cargado negativamente no puede penetrar la membrana sin embargo, el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) que es neutro consigue penetrar la membrana y desestabilizar la estructura interna de la bacteria provocando su muerte.

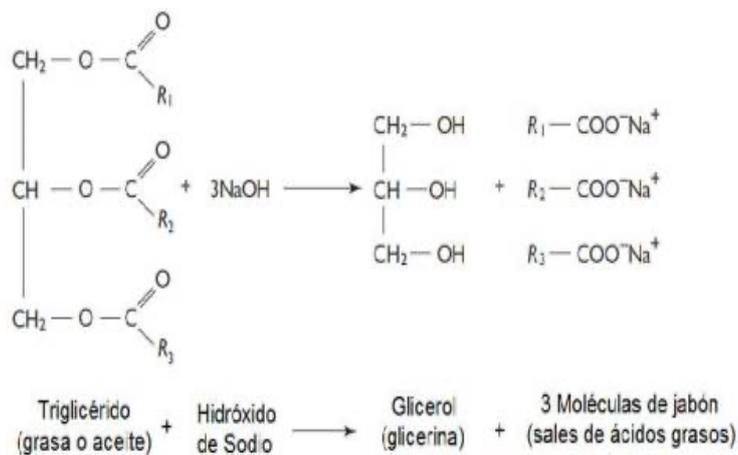
A su vez, cuando el hipoclorito de sodio entra en contacto con tejido orgánico ocurren las siguientes fórmulas químicas (**Figura 12**):



**Figura 12.** Imagen resumida de las 3 reacciones principales que ocurren cuando el hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ) entra en contacto con tejido orgánico. Las tres reacciones son la **Saponificación** (1), **Neutralización** (2) y **Cloraminación** (3) (20).

Estas reacciones químicas que ocurren entre el tejido orgánico (12, 14, 15) y el hipoclorito de sodio, se suceden en el siguiente orden.

Al entrar en contacto el hipoclorito de sodio con el tejido orgánico se produce la primera de las reacciones químicas que es la **saponificación**. La **saponificación** es un proceso químico por el cual un cuerpo graso (en este caso el hipoclorito actúa como ácido graso orgánico), unido a una base y agua, da como resultado jabón y glicerina, lo que reduce la tensión superficial de la solución restante.



A continuación, de manera casi de manera simultánea se produce la segunda reacción de **neutralización**. El hipoclorito de sodio neutraliza los aminoácidos formando agua y sal. Con la salida de los iones de hidroxilo, hay un aumento del pH. Estrela y cols (18, 19) estudiaron el efecto biológico del pH sobre la actividad enzimática de las bacterias anaerobias. Los sitios enzimáticos se encuentran en la membrana citoplasmática, que es responsable de funciones esenciales tales como el metabolismo, la división celular y el crecimiento, formación de la pared celular, la biosíntesis de lípidos, el transporte de electrones o la fosforilación oxidativa (18, 19). El gradiente de pH de la membrana citoplasmática se ve alterado por la alta concentración de iones hidroxilo por la acción del hipoclorito, que actúan sobre las proteínas de la membrana (desnaturalización proteica). El alto pH (12,5), influenciado por la liberación de iones hidroxilo, altera la integridad de la membrana citoplasmática por medio de lesiones químicas de los componentes orgánicos y el transporte de nutrientes, o mediante la degradación de fosfolípidos o ácidos grasos insaturados ácidos grasos insaturados de la membrana

citoplasmática, observada en el proceso de peroxidación, que es una reacción de **saponificación** (18).

El ácido hipocloroso, presente en la solución de hipoclorito de sodio, cuando entra en contacto con el tejido orgánico actúa como disolvente, libera cloro que, combinado con el grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) de la proteína, forma cloraminas (tercera reacción, **cloraminación**). El ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) y los iones de hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) conducen a la degradación e hidrólisis de los aminoácidos y por tanto de la disolución (18-20).

Esta tercera reacción, la reacción de **cloraminación** entre el cloro y el grupo amino ( $\text{NH}$ ) forma cloraminas que interfieren en el metabolismo celular bacteriano. El cloro (oxidante) presenta una acción antimicrobiana que inhibe las enzimas bacterianas y conduce a una oxidación irreversible de los grupos ( $-\text{SH}$ ) de las enzimas bacterianas esenciales, como se ha explicado anteriormente (16-18, 20).

Es por esto que el hipoclorito de sodio presenta actividad antimicrobiana con acción sobre los sitios enzimáticos esenciales de las bacterias, promoviendo la inactivación irreversible originada por los iones hidroxilo y la acción de la **cloraminación**. La disolución del tejido orgánico puede verificarse en la reacción de saponificación cuando el hipoclorito de sodio degrada los ácidos grasos y los lípidos, dando como resultado jabón y glicerol (18-20).

La capacidad de disolución de tejido orgánico y efecto antimicrobiano del hipoclorito de sodio está condicionada por tres factores: concentración, temperatura y pH (18, 20).

La concentración a la que se usa en clínica el hipoclorito de sodio varía entre aproximadamente el 1% hasta el 6%. Aunque no hay evidencia de cuál es la concentración óptima, la mayoría de los autores están de acuerdo en que una concentración de hipoclorito de sodio es más efectiva a concentraciones altas que a concentraciones bajas (10, 21, 22). Clegg y cols (23) llegaron a afirmar que la única concentración capaz de eliminar biofilm impidiendo que se reprodujera de nuevo era una concentración del 6%.

A su vez la efectividad antimicrobiana, igual que en la disolución de tejido orgánico, una mayor concentración aumenta su efecto, como se ha visto en los estudios de Spano y cols (24) y Siquera y cols (25).

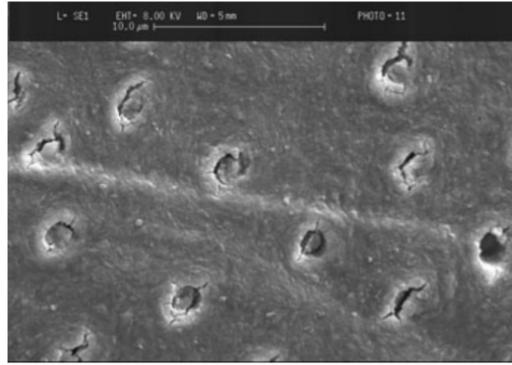
La temperatura influye también de manera directa, ya que si esta aumenta, la acción de hipoclorito aumenta, tanto para la disolución de tejido orgánico como la capacidad antimicrobiana (26). Sirtes y cols (27) demostraron el mismo efecto antimicrobiano usando hipoclorito 1% a 45 grados e hipoclorito 5,25% a 20 grados.

En relación al pH, el hipoclorito de sodio, es una solución alcalina que posee un pH de aproximadamente 11,6. Spano y cols (24) observaron que al disminuir el pH del hipoclorito de sodio a 9, con el consecuente cambio en el equilibrio químico con la formación de ácido hipocloroso, disminuyó la velocidad de disolución de los tejidos. Por otro lado, el aumento de pH y la formación de ácido hipocloroso aumenta la cantidad de cloro libre en el medio y por tanto aumenta la efectividad antimicrobiana. Por tanto, a mayor pH, mayor efecto antimicrobiano pero menor efecto en la disolución de tejidos y al revés, a menor pH, mayor efecto en la disolución de tejido orgánico pero menor efecto antimicrobiano (24, 27).

### **Barrillo dentinario (*smear layer*)**

El hipoclorito de sodio es, por tanto, el irrigante ideal para disolución de tejido orgánico y eliminación de microorganismos. Sin embargo, durante la preparación del conducto radicular, se originan además de restos orgánicos (pulpa y predentina) restos inorgánicos que se depositan sobre las paredes del conducto y forman una capa de barrillo dentinario conocida como ***Smear Layer*** (28) (**Figura 13**).

Este barrillo dentinario o ***Smear Layer*** está formado por 2 capas: una superficial, poco adherida a las paredes dentinarias, irregular, densa y amorfa (29-31) con un espesor de 1 a 2  $\mu\text{m}$  y otra más profunda que forma tapones dentro de los túbulos dentinarios obliterándolos total o parcialmente (29). Esta última capa puede variar en función del tipo de instrumentación que se emplee, la edad del diente o cantidad de irrigante usado (32, 33).



**Figura 13.** Imagen de los túbulos dentinarios obstruidos por el barrillo dentinario después de la instrumentación mecánica. Imagen tomada de Violich y cols (34).

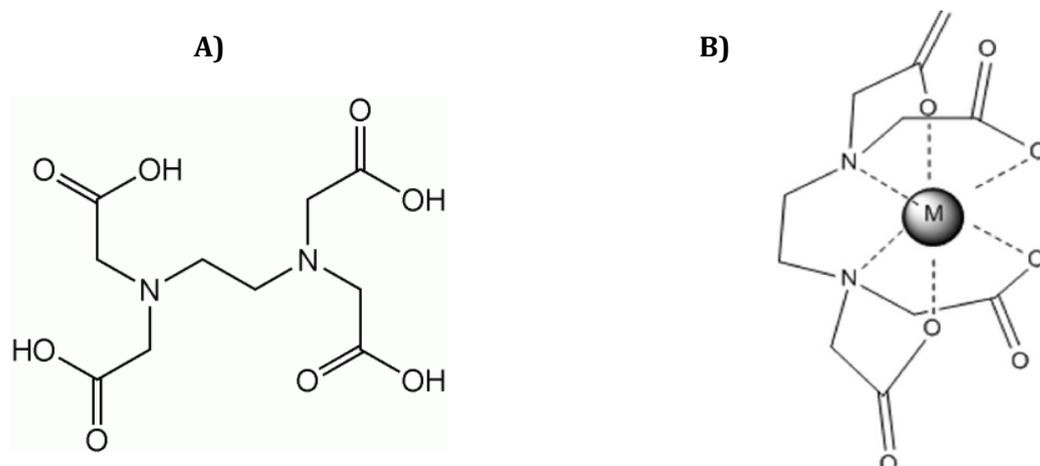
En conductos infectados pueden encontrarse también microorganismos en el barrillo dentinario (29). Estos pueden permanecer y luego migrar a otras zonas (10, 22, 35, 36).

Este barrillo dentinario debido a la obstrucción que produce en los túbulos dentinarios disminuye la capacidad de difusión dentro del conducto tanto del hipoclorito de sodio como de posibles medicaciones intraconducto, además de dificultar la obturación definitiva (37, 38).

El barrillo dentinario, contiene principalmente sustancias inorgánicas. Ya que el hipoclorito de sodio no tiene efecto sobre sustancias inorgánicas, es preciso la ayuda de quelantes para disolver esta capa (29). Esto se debe a que los componentes de la capa de barrillo dentinario son pequeñas partículas con una gran relación superficie/masa, altamente solubles en ácidos denominados quelantes (39).

## Quelantes

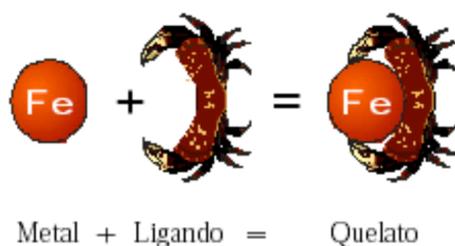
El término 'quelante' deriva de la palabra griega 'chele' (garra de cangrejo). Los quelantes son complejos particularmente estables de iones metálicos con sustancias orgánicas como resultado de enlaces en forma de anillo (**Figura 14**). Esta estabilidad es el resultado del enlace entre el quelato, que tiene más de un par de electrones libres, y el ión metálico central (40).



**Figura 14. A)** Estructura química del quelante EDTA. **B)** Unión del quelante EDTA con un metal (M).

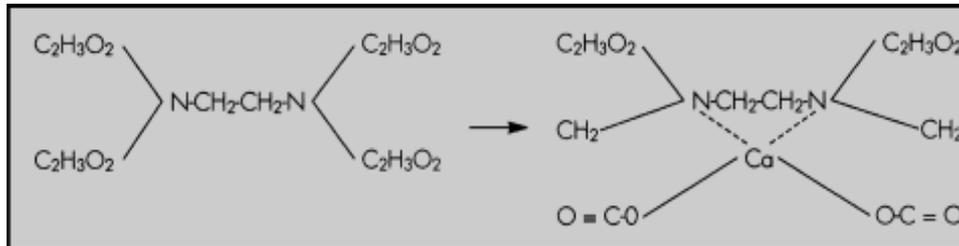
La principal característica de los quelantes por la que es usada en Odontología es la capacidad de unirse e inactivar los iones metálicos (**Figura 15**), tales como el Calcio (Ca), hierro (Fe), el Cobalto (Co) o Manganeseo (Mn) entre otros. En 1951 se publicaron los primeros informes sobre el efecto desmineralizador del EDTA en los tejidos duros dentales (2). La primera vez que se usaron los quelantes en endodoncia fue en 1957 por Nygaard-Ostby (12, 41), quién recomendó el uso de una solución de EDTA al 15% y un pH 7.3.

Son sustancias normalmente ácidas, cuyo mecanismo de acción es la captación de iones de calcio presentes en la dentina, para reducir su tensión superficial, reblandecer las paredes dentinarias y así facilitar la limpieza y conformación de estas superficies (40).



**Figura 15.** Esquema de la captación de un metal, en este caso una molécula de hierro, por un quelante(40).

No todos los quelantes fijan todos los iones metálicos, hay por tanto una especificidad, el ácido etilendiaminetetracético (EDTA) (**Figura 16**), es un quelante específico para el ión calcio y en consecuencia para la dentina. Es el quelante por excelencia en endodoncia (2).



**Figura 16.** Imagen de la reacción química del EDTA y su reorganización tras la captación de un ión de calcio (13).

### ***Medios de quelantes***

Según el medio en el que se vayan a emplear los quelantes pueden ser:

- Quelantes líquidos: para su empleo en la irrigación del conducto radicular principalmente en el protocolo de irrigación final, para potenciar el efecto antimicrobiano al eliminar el barrillo dentinario adherido a los túbulos dentinarios y potenciar el efecto antimicrobiano del NaOCl.
- Quelantes tipo pasta: de solución pastosa para su empleo en la preparación del conducto radicular. Se usan solo al principio de la endodoncia para favorecer la permeabilidad del conducto y sobre todo en casos de metamorfosis cálcica.

Los quelantes tanto en líquido como gel deben usarse siempre en los tratamientos de endodoncia y son especialmente recomendados en conductos radiculares estrechos y calcificados (42-45).

## ***Quelantes fuertes y débiles***

Según su forma de unión y poder complejante, se clasifican en fuertes (EDTA) y débiles como el ácido etidróico (HEDP). Cuanto más fuerte sea un quelante, más estable es la unión, esperándose mayor solubilidad del producto, más eficiencia de aplicación y mejor absorción (41).

### ***Etilendiaminotetracético (EDTA)***

El EDTA es el quelante más usado en endodoncia (41). Al igual que el hipoclorito de sodio también se ha usado a diferentes concentraciones que oscilan entre el 9% y el 17%. Se estima que entorno a partir del 10% presenta una inhibición bacteriana como evidenciaron Kotula y Bardacova en 1970 (46). El EDTA en su forma pura tiene una tensión superficial más baja que el 1- 5% de hipoclorito de sodio (NaOCl) (9).

Comúnmente se usaba el EDTA al comienzo de la endodoncia para lubricar la entrada del conducto y recorrido dentro del mismo, principalmente en conductos estrechos o calcificados. Nikiforuk y Sreebny (2) definieron que el pH ideal para emplear el EDTA en descalcificación dentinaria era próximo al neutro, unos 7,5. Segura y cols (13) definieron los usos principales por los que debemos usar el EDTA durante el tratamiento endodóntico (**Figura 17**).

1. Localización de la entrada de los conductos.
2. Ensanchamiento químico sencillo e «inocuo».
3. Eliminación del barrillo dentinario.
4. Mejor limpieza mecánica de la pared dentinaria.
5. Desinfección de la pared dentinaria (acción antibacteriana).
6. Aumento de la permeabilidad dentinaria a medicamentos.
7. Mayor adhesión del cemento a la pared dentinaria.
8. Facilita la extracción de instrumentos rotos.
9. Preparación de conductos estrechos y/o calcificados

**Figura 17.** Tabla de propiedades generales del EDTA (13).

## Principales características del EDTA:

### Desmineralización

Nygaard-Østby (47) utilizó el principio de un producto de solubilidad constante para explicar la desmineralización del tejido duro dental por el EDTA y su sal de sodio. Se establece un equilibrio entre la solución salina saturada y el precipitado consolidado porque los iones del precipitado entran constantemente en la solución, mientras que, al mismo tiempo, los iones de la solución se precipitan como sólidos. La concentración de la sal se mantiene constante y, por lo tanto, el producto de las concentraciones de los iones en la solución a una temperatura determinada (el producto de la solubilidad) se mantiene estable. En la dentina los componentes minerales son principalmente el fosfato y el calcio que son solubles en agua. Cuando se añade a este equilibrio la sal del EDTA, se eliminan los iones de calcio de la solución. Esto conduce a la disolución de más iones de la dentina, de manera que el producto de solubilidad permanece constante. Así, los quelantes provocan la descalcificación de la dentina (48).

### Cambios en la dureza de la dentina

El valor de dureza de la dentina radicular se encuentra entre 40 y 75 kg mm<sup>-2</sup> dureza de Vickers (49, 50). La dureza de la dentina varía según la superficie donde se encuentre. Aumenta desde el interior del conducto hacia la unión cemento-dentinal, y disminuye desde coronal hasta apical (49).

Estudios previos han demostrado la reducción de la dureza de la dentina cuando es tratada con un quelante. Esta acción tiene lugar principalmente en la parte coronal y partes amplias del conducto, pero no en zonas estrechas ni en el ápice radicular (50, 51).

Esta variación se debe por un lado a la dificultad de llevar el quelante a las zonas más estrechas y tercio apical, y también refleja las diferencias de estructura entre la dentina media, coronal y apical (52, 53).

### *Cambios en la permeabilidad de la dentina*

La permeabilidad de la dentina está marcada por los túbulos dentinarios. Estos son más numerosos y anchos en zonas próximas a la cavidad pulpar. El número de túbulos cercano a la pulpa es de 58000 mm<sup>2</sup> con un diámetro de 1,2 μm respecto a 10000 mm<sup>2</sup> y un diámetro de 0,4 μm en zonas de unión dentina-cemento (54, 55).

Después de la instrumentación mecánica, la formación del barrillo dentinario provocado por esta, reduce la permeabilidad de la dentina entre 25-49% (56). Por eso, es importante manejar y eliminar todo este material inorgánico de dentro del conducto radicular mientras se instrumentan las superficies, ya que la permeabilidad de la dentina depende directamente del área de la luz de los túbulos.

Numerosos estudios han reportado que la irrigación con una solución de EDTA al 17% tiene un buen efecto en la limpieza de las paredes del conducto radicular y sobre los túbulos dentinarios se vuelven más grandes y visibles por la disolución de la dentina peritubular y la eliminación de tejido inorgánico (57-61).

Este aumento en la permeabilidad de la dentina se debe al empleo del EDTA y su acción en la eliminación del barrillo dentinario. Como consecuencia de este agrandamiento de las entradas de los túbulos dentinarios se facilita la entrada de irrigante, mejora la difusión de medicación intraconducto y también el material de sellado durante la fase de obturación. (59-61).

### *Efectos antibacterianos del EDTA*

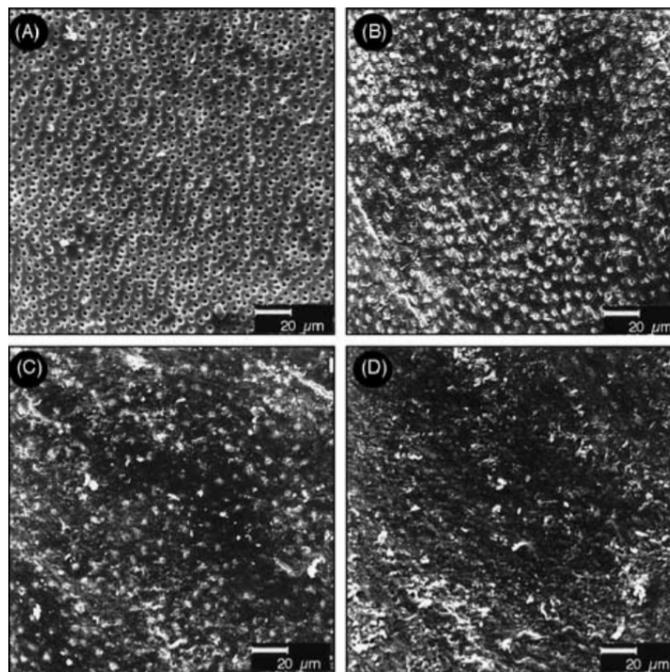
El EDTA por sí solo presenta un efecto antibacteriano limitado. La actividad antibacteriana se debe a la quelación de los cationes de la membrana externa de las bacterias, esto hace que desestabilice su estructura y favorezca el desprendimiento de las superficies en las que se encuentran adheridas.

Yoshida y cols (62) examinaron la eficacia de una solución de EDTA al 15% utilizada en combinación con ultrasonido. No se encontraron bacterias en el conducto radicular en 93 de los 129 casos. El EDTA demostró tener un mayor

efecto antimicrobiano comparándolo con solución salina. Los autores concluyeron que al actuar en la eliminación de barrillo dentinario se disminuye el nivel bacteriano, mediante arrastre mecánico.

El uso combinado de EDTA y NaOCl 5,25% tiene un mayor efecto antimicrobiano que el NaOCl solo (63). Yang & Bae (64) encontraron menos bacterias (*Prevotella nigrescens*) adheridas a la dentina radicular cuando se combinaban ambos irrigantes, que en los conductos radiculares donde el barrillo dentinario no se había eliminado.

Por lo tanto, gracias a la capacidad del EDTA de disolver los componentes inorgánicos del barrillo dentinario, se recomienda su uso en combinación con NaOCl (concentraciones desde 0.5 a 5.25%) para aumentar la remoción de los remanentes orgánicos (41, 65). Yamashita y cols (65) igualmente vieron que la acción de limpieza y efecto antibacteriano es mayor cuando se combinan juntos que separados (**Figura 18**).



**Figura 18.** Imágenes tomadas del estudio de Yamashita et al (65). En ellas se puede apreciar la evolución después de haber usado el EDTA y como favorece la entrada y localización de los túbulos dentinarios. Foto final (A) donde ya hemos usado el EDTA comparado con la figura inicial antes de usarlo donde apenas se pueden distinguir (D).

Sin embargo, otros estudios avalan que el NaOCl reduce su capacidad de disolución así como la reducción de cloro libre y efecto antibacteriano en presencia de EDTA, lo que disminuye la eficacia antibacteriana del NaOCl (66). No obstante, como se verá más adelante esto se debe principalmente al tipo de sal de EDTA que se use al combinar con el NaOCl y no al EDTA en sí.

### ***Ácido Etidróico***

El otro quelante importante usado en endodoncia es el ácido etidróico (HEDP). El HEDP no es tóxico y se usa en medicina para tratar enfermedades óseas sistémicas (67, 68), por la capacidad que tiene de fijación del calcio, al igual que los otros quelantes (68-70).

Presenta características muy parecidas respecto al EDTA en su actuación contra el barrillo dentinario y desmineralización (**Figura 19**). Previamente se ha intentado analizar su efectividad antibacteriana en combinación con el NaOCl (57). Los resultados obtenidos parecen indicar que es una mejor opción respecto al EDTA para combinarlo con el NaOCl en protocolo de irrigación final (48, 57, 58, 70, 71).

Se considera como un posible sustituto del EDTA porque puede ser mezclado con NaOCl sin interferir o muy poco con el pH en el medio. La eficacia antibacteriana del NaOCl y su potencial de disolución de tejido orgánico está marcada por el cloro libre disponible en solución (69). Este cloro libre depende del pH y el HEDP apenas altera el pH del medio (68, 70, 71). Esto hace que el NaOCl y el HEDP permanezcan activos cuando se mezclan. Esta mezcla se utiliza durante la preparación biomecánica, el NaOCl con HEDP disuelve los restos de pulpa y elimina los microorganismos, a la vez que se previene la formación de barrillo dentinario.

Sin embargo, algunos estudios vieron una ligera reducción en la actividad de disolución de la materia orgánica al analizar la mezcla de NaOCl con El HEDP. Esto se debió probablemente al hecho de que esta sustancia por su naturaleza quelante (72, 73) pueda ser capaz causar una ligera reducción en la Contenido de cloro libre disponible (68)

**A)**

Protocol	Canal third	Clean root canal		Smear layer present		
PTN + NaOCl + EDTA	Coronal	53% (10/19)	16% (3/19)	26% (5/19)	0	5% (1/19)
		69% (13/19)		31% (6/20)		
	Mid-root	30% (6/20)	25% (5/20)	15% (3/20)	20% (4/20)	10% (2/20)
		55% (11/20)		45% (9/20)		
	Apical	25% (5/20)	5% (1/20)	30% (6/20)	15% (3/20)	25% (5/20)
		30% (6/20)		70% (12/20)		
PTN + DR	Coronal	55% (11/20)	10% (2/20)	20% (4/20)	10% (2/20)	5% (1/20)
		65% (13/20)		35% (7/20)		
	Mid-root	37% (7/19)	26% (5/19)	10.5% (2/19)	16% (3/19)	10.5% (2/19)
		63% (12/19)		37% (7/20)		
	Apical	50% (10/20)	5% (1/20)	15% (3/20)	15% (3/20)	15% (3/20)
		55% (11/20)		45% (9/20)		

**B)**

Protocol	Canal third	Clean root canal		Debris present		
PTN + NaOCl + EDTA	Coronal	53% (10/19)	32% (6/19)	10% (2/19)	0	5% (1/19)
		85 (16/19)		15% (3/19)		
	Mid-root	60% (12/20)	40% (8/20)	0	0	0
		100% (20/20)		0% (0/20)		
	Apical	85% (17/20)	10% (2/20)	0	0	1/20
		95% (19/20)		5% (1/20)		
PTN + DR	Coronal	65% (13/20)	30% (6/20)	5% (1/19)	0	0
		95% (19/20)		5% (1/20)		
	Mid-root	53% (10/19)	42% (8/19)	5% (1/20)	0	0
		95% (18/19)		5% (1/19)		
	Apical	70% (14/20)	25% (5/20)	0	0	5% (1/20)
		95% (19/20)		5% (1/20)		

**Figura 19.** (A) tabla de acción de los quelantes EDTA y HEDP (DR, dual rinse) sobre el barrillo dentinario “*smear layer*” en tercio coronal medio y apical usando como sistema rotatorio Protaper Next (PTN). (B) Tabla con la acción de los quelantes sobre los restos dentinarios. En ambas tablas muestran resultados muy parecidos (57).

### ***Tiempo de trabajo de los quelantes***

Se ha observado que una buena eficacia de limpieza del EDTA, tanto en solución acuosa como en gel, requiere un tiempo de trabajo de entre 1 y 5 minutos (74, 75).

Calt y cols (58, 76) observaron que una exposición 10 mL de EDTA durante 1 minuto fue suficiente para remover la capa de barrillo, mientras que una exposición durante 10 min causó una excesiva erosión peritubular e intratubular lo que provoca deformaciones en las superficies de los conductos radiculares (76).

No se puede dar una recomendación definitiva sobre la cantidad y el tiempo de trabajo óptimos para un quelante en pasta o líquido en condiciones clínicas, lo que sí se observa es que un minuto es tiempo suficiente para que el EDTA actúe contra el barrillo dentinario y que un tiempo más prolongado puede ser dañino para las superficies.

El HEDP al ser un quelante débil, es menos agresivo que el EDTA en la dentina, presenta las mismas características contra el barrillo y restos dentinarios, pero crea menos erosiones en las superficies de los conductos (70, 72).

### ***Quelación continua***

En 2005 se introdujo el concepto llamado quelación continua, en el que se empleaba de manera continuada el hipoclorito de sodio junto con el quelante, EDTA o HEDP durante los protocolos de irrigación final (32, 68).

Los quelantes que se proponen en el protocolo de quelación continua son el EDTA, concretamente sal tetrasódica de EDTA en vez de sal disódica y el HEDP para alternarlos junto al hipoclorito de sodio (69). El empleo de estas nuevas fórmulas hace que el NaOCl se mantenga unas condiciones alcalinas (77).

Estas condiciones, permiten la mayor concentración de hipoclorito en el medio y favorecen la disolución de tejido orgánico (78) que combinados con los quelantes permiten una mayor difusión dentro de los conductos gracias a la eliminación de los restos inorgánicos.

Por otro lado, los quelantes promueven el desprendimiento de las biopelículas de las paredes dentinarias favoreciendo la desinfección de los conductos radiculares (9,79) y además interfieren en procesos de nutrición bacteriana al captar los iones metálicos que intervienen en este proceso (80).

Zehnder y cols (68) vieron que con una concentración menor de hipoclorito de sodio (NaOCl 1%) combinado con un quelante en la quelación continua, se reduce la presencia de cloro libre disponible disminuyendo el pH. Con esto el efecto antimicrobiano y la disolución de tejidos del NaOCl disminuye. Por eso es

conveniente que al combinar ambos, se usen concentraciones mayores de NaOCl para no perder sus propiedades (68) (**Figura 20**).

Agent	Wt/vol	Ratio	pH	1 min	1 h	1 d	21 d
(H2O)	-	1:1	11.7	100%	100%	100%	100%
		5:1	11.2	100%	100%	100%	100%
		1:5	11.9	100%	100%	100%	100%
EDTA	17%	1:1	8.2	10%	0%	0%	0%
		5:1	8.0	10%	0%	0%	0%
		1:5	8.4	10%	0%	0%	0%
Citric acid	10%	1:1	2.4	0%	0%	0%	0%
		5:1	1.8	0%	0%	0%	0%
		1:5	4.3	0%	0%	0%	0%
STP	9%	1:1	9.8	100%	100%	100%	100%
		5:1	9.3	100%	100%	100%	100%
		1:5	10.6	100% <sup>1</sup>	100%	100%	100%
ATMA	15%	1:1	0.8	10%	0%	0%	0%
		5:1	0.6	0%	0%	0%	0%
		1:5	1.1	20%	0%	0%	0%
HEBP	7%	1:1	10.7	100%	80%	20%	0%
		5:1	10.6	100%	50%	10%	0%
		1:5	11.3	100%	100%	90%	20%

**Figura 20.** La disminución de pH influye directamente en la proporción de cloro disponible cuando se combina una solución de hipoclorito de sodio 1% combinado con EDTA y HEDP. En este estudio de Zehnder y cols (68) evaluaban los resultados en el tiempo. En nuestro caso nos interesa conocer la disponibilidad en 1 minuto, que es el tiempo que realizamos durante el protocolo final de irrigación.

Por último, en la quelación continua el efecto de la temperatura es importante ya que con el aumento de temperatura ocurren reacciones químicas más frecuentemente, acelerando el agotamiento de cloro libre disponible y reduciendo por tanto la efectividad de los irrigantes combinados. (69). Por esto se recomienda si se usan ambos, realizarlo a temperatura ambiente.

## Técnicas de irrigación

El principal objetivo de la irrigación es acceder al mayor número de superficies y provocar la eliminación de los microorganismos y toxinas presentes en los conductos radiculares. Esta eliminación nunca puede ser completa, pero si debe reducir los microorganismos a unos niveles tan bajos que permitan la curación clínica (81).

Se ha estudiado recientemente que con una instrumentación mecánica y una irrigación convencional se logra a una desinfección de aproximadamente un 60%,

por lo que existe evidencia de que hay zonas a las que no se consigue llegar y tratar convenientemente (71). Este hecho hace que sea necesario buscar métodos o tratamientos alternativos en la irrigación que permitan acceder a esas superficies que de otra forma no se pueda limpiar, para mejorar estos porcentajes de reducción de microorganismos. También es importante la forma de la irrigación con los quelantes para que eliminen el barrillo y favorezca una mejor penetración del irrigante a los túbulos dentinarios (71, 82).

De estos métodos, el más importante es la activación (**Figura 21**). La activación se realiza para mejorar y potenciar las capacidades del irrigante dentro del conducto radicular. Entre los métodos de activación se encuentran: la activación manual y la activación de la irrigación asistida por instrumental mecánico (83).

<b>Técnicas de activación en la irrigación</b>	
<b>Manual</b>	
	Activación mediante jeringa convencional o cánula.
	Cepillos.
	Agitación manual dinámica.
<b>Mecánico-asistida</b>	
	Cepillos rotatorios.
	Activación del irrigante en la instrumentación rotatoria.
	Sónica.
	Ultrasónica.
	Dispositivo de presión alternativa.

**Figura 21.** Esquema de adaptación de las diferentes técnicas de activación del irrigante.

La irrigación manual con jeringa está orientada a odontólogos generales. Consta de una jeringa y una cánula que puede tener salida frontal o lateral (**Figura 22**) (84). Es un método muy usado por la facilidad que tiene para irrigar y controlar el

volumen que dispensamos dentro del conducto. La activación del irrigante en este caso se realiza mediante la agitación de la jeringa dentro del conducto de forma manual (84, 85).



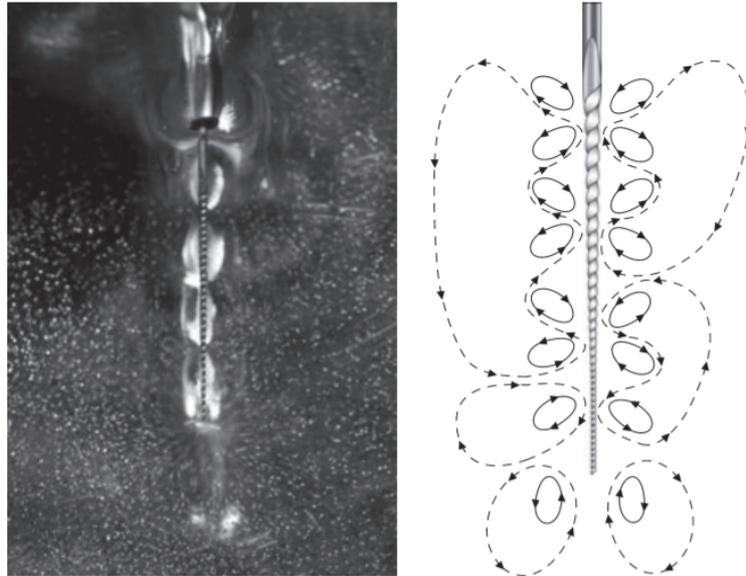
**Figura 22.** Diferentes salidas de jeringas convencionales en endodoncia 30-G, tanto salida frontal (A) como de salida lateral (B-F) (84).

Otras técnicas usadas para la activación de irrigación manual son los cepillos o la activación mediante cono de gutapercha maestro, agitándolo de forma manual dentro del conducto. Estos métodos de activación están en desuso ya que se ha visto que tienen carencias (86).

### **Activación sónica y ultrasónica**

En la activación asistida por instrumental mecánico figuran principalmente la activación sónica y la ultrasónica. Existen otros métodos, como la activación por cepillo rotatorio (300 rpm) descrito por Ruddle, (87) o la activación de irrigación continua mediante la instrumentación rotatoria en el que el irrigante se activa cuando pasamos las limas rotatorias (88). Sin embargo, estos últimos presentan una menor garantía frente a la activación sónica y la ultrasónica (88).

Tanto los sistemas sónicos como ultrasónicos producen la activación del irrigante mediante un movimiento pulsátil, creando una activación hidrodinámica. Difieren ambos en la frecuencia siendo los sónicos (1-8 khz) y los ultrasónicos (25-30 khz). Estos movimientos oscilatorios tienen lugar en la punta del instrumento provocando la activación y produce el fenómeno conocido como microcorriente acústica y cavitación (88) (**Figura 23**).



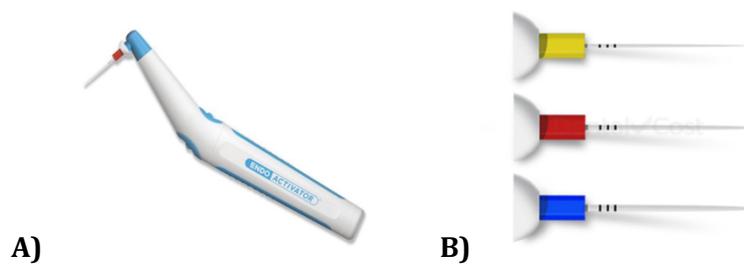
**Figura 23.** Representación del movimiento cíclico y de microcorriente acústica del irrigante al ser activado (89).

### ***Conceptos de microcorriente acústica y cavitación***

La microcorriente acústica es la circulación de un fluido inducida por las fuerzas creadas por la vibración hidrodinámica de un objeto vibratorio activado por ultrasonido. Cuando un objeto oscilante con una baja amplitud de desplazamiento es sumergido en un líquido, se forman patrones de oscilación del fluido alrededor del objeto. Estas oscilaciones van a formar corrientes en remolino, que crean un gradiente de velocidad produciendo tensiones vibratorias, de manera que cualquier material biológico que entre en el área de la corriente va a ser sometido a tensiones vibratorias y puede resultar dañado (89-92).

La cavitación del irrigante es la formación de vacíos submicroscópicos como resultado de vibrar un medio fluido por el movimiento alternante de alta frecuencia de la punta de un instrumento. Cuando estos vacíos hacen implosión, se crean ondas de choque que se propagan a través del medio y producen liberación de energía en forma de calor (89-91).

En la activación sónica un instrumento utilizado con frecuencia es el Endoactivator (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK) (**Figura 24**). El tiempo de activación en la activación sónica es de 3 minutos. No hay un consenso establecido sobre los ciclos o tiempos dentro de estos 3 minutos, variando entre 10 segundos a 30 segundos o incluso un minuto por ciclo (93-95).



**Figura 24.** (A) Endoactivator (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK) para activación sónica. (B) diferentes calibres de puntas de activación varían desde el 20, 25 y 30.

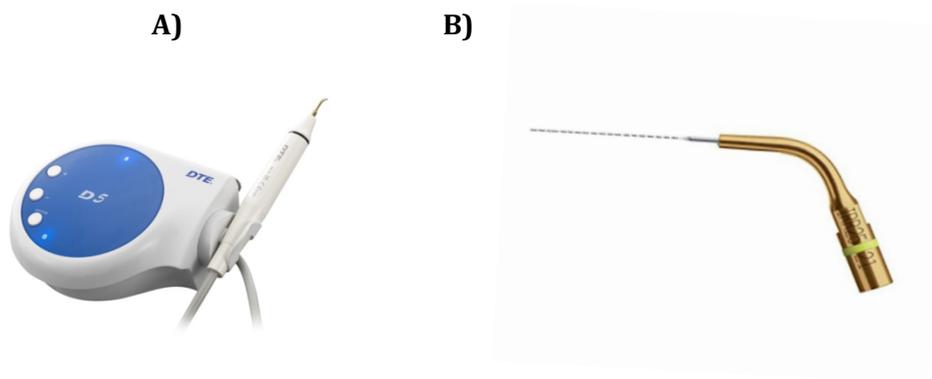
En la activación ultrasónica, la primera propuesta descrita para el uso de sistemas ultrasónicos en el tratamiento de conductos radiculares fue de Richman en 1957 (96). En 1980, Martin y cols, iniciaron el uso de la energía ultrasónica para instrumentar e irrigar los conductos con un sistema sinérgico ultrasónico endosónico (97).

Sabin y cols (98) y Stamos y cols (99) observaron una mayor capacidad de remoción de barrillo dentinario en la activación ultrasónica frente a la sónica. Esto es debido a la mayor frecuencia con la que actúa la activación ultrasónica, creando una mayor corriente acústica, lo que permite una mayor remoción de todo el tejido.

La literatura describe dos tipos de irrigación ultrasónica. El primer tipo sería en la que el instrumento contacta con las paredes del conducto, tiene un efecto simultáneo con la instrumentación, es la llamada irrigación ultrasónica (UI). La segunda forma sería la que activa el irrigante tocar las paredes del conducto, no tiene por tanto efecto en la instrumentación. Es la conocida como activación ultrasónica pasiva (PUI) (88, 97).

Weller y cols (100), fueron los primeros en utilizar este tipo de irrigación PUI. Describieron este proceso en el que después de realizado la biomecánica se procedía a un protocolo de irrigación final con una punta ultrasónica, que, sin tocar las paredes de los conductos radiculares, agitaba por ondas el líquido irrigante potenciando el efecto del mismo (88, 97).

Dentro de la activación ultrasónica pasiva (PUI), la literatura refiere dos tipos de maneras utilizarla. La activación ultrasónica continua (100), aquella en la que una vez instrumentado el conducto se introduce el irrigante y la punta ultrasónica a la vez. Hay un flujo continuo de activación, en el que el irrigante entra dentro del conducto mientras se va activando por medio de la pieza de mano (**Figura 25**). El tiempo efectivo para eliminar todo el tejido pulpar y barrillo dentinario de dientes vitales y necróticos es de 2 minutos, aunque diversos autores han visto igual de eficacia a 1 minuto (83, 101, 102).



**Figura 25.** (A) Equipo de Ultrasonidos portátil con autoregulación y (B) una punta de ultrasonidos irrisafe 21.

La otra forma de activación es la activación ultrasónica pasiva con flujo intermitente. Se emplea una jeringa y el equipo ultrasónico. Se tiene un mayor control de cuánto se introduce la jeringa y el irrigante dentro del conducto, el

volumen empleado suele ser de 3 mL, y la activación tiene lugar mediante ciclos de tiempo. Al igual que la continua el tiempo es de un minuto, pero hay diferencias en el tiempo empleado por cada ciclo. Varían entre 10, 15, 20 y 30 segundos. Aunque la mayoría sugieren 20 segundos por ciclo (83, 101).

En el metaanálisis publicado en 2019 sobre la activación ultrasónica, Petruța y cols (83) trataron de averiguar si tenía mayor eficacia la activación ultrasónica pasiva frente a la remoción de tejido pulpar, barrillo dentinario, efecto antimicrobiano y curación de periodontitis apical comparado con otras técnicas de irrigación. De toda la literatura publicada no encontraron un consenso establecido sobre la manera de irrigación, tiempos y ciclos. Sí observaron que los estudios que emplearon en la irrigación ultrasónica pasiva intermitente tuvieron mejores resultados sobre todo en la eliminación de tejido pulpar y de barrillo dentinario. Esto es debido al cambio de irrigante entre ciclos, lo que facilitaba el flujo y la remoción de material entre cada lavado por ciclo (83, 102, 103).

## **Bacterias**

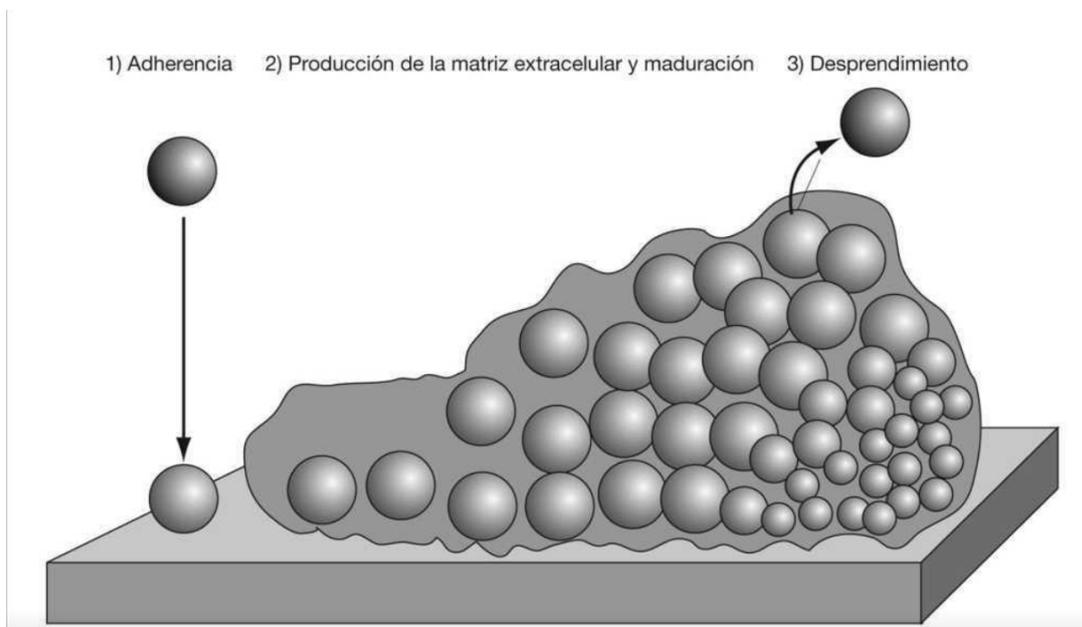
### **Generalidades**

La mayoría de las infecciones endodónticas son de causa bacteriana (104). De entorno a las 600 especies microbianas relacionadas con la cavidad oral, aproximadamente se identifican en cada individuo de 50 a 150 (104).

Dentro de la cavidad oral hay zonas que son susceptibles de ser colonizadas superficialmente por microorganismos. Los tejidos duros dentinarios como el esmalte actúan de barrera frente a este tipo de colonizaciones. La alteración o destrucción de estos tejidos de forma parcial o completa, ya sea por caries, traumatismos u otras etiologías hace que los microorganismos colonicen y progresen dentro del diente hacia la cavidad pulpar llegando a provocar una inflamación o, si persisten en el tiempo, una necrosis pulpar, y a su vez estas necrosis pueden llegar ocasionar lesiones periapicales (105, 106). Estos procesos comienzan con la placa dental, una película de microorganismos que se adhiere a la superficie del diente (106, 107).

## Película dental y colonización bacteriana

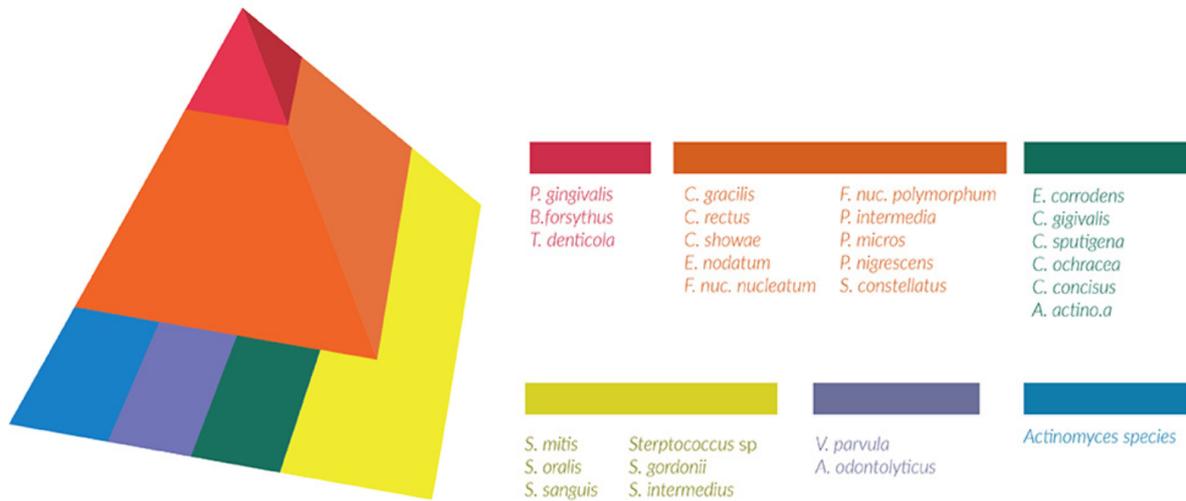
Las bacterias que componen la placa dental presentan un alto grado de organización y está formada por una colonización secuencial y ordenada. Durante el proceso de formación de la placa dental, algunas especies de bacterias orales, conocidas como colonizadores primarios o tempranos, se adhieren a la película adquirida que recubre la superficie dental, la cual está compuesta de proteínas salivales (mucinas,  $\alpha$ -amilasa, proteínas ricas en prolina...) y fragmentos de células bacterianas (105, 108, 109). Posteriormente los colonizadores tardíos se unen a los colonizadores primarios ya adheridos (**Figura 26**).



**Figura 26.** Diagrama adaptación de las etapas de la formación de la biopelícula en la superficie del diente. Se puede apreciar en las primeras fases la desnaturalización de la superficie para permitir la adhesión bacteriana y como una vez adheridos y organizados se produce la dispersión a otras superficies (109).

Los estreptococos constituyen el 47-82% del microbiota que coloniza la superficie dental. Dentro de esta placa, se debe diferenciar según su localización la placa supragingival y la placa subgingival. La placa supragingival está dominada por bacterias Gram-positivas (*Streptococcus sp.*, *Actinomyces sp.*) mientras que la placa

subgingival está compuesta principalmente por bacterias anaerobias Gram-negativas (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *Camphylobacter spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, espiroquetas orales) (106, 110, 111) (**Figura 27**).



**Figura 27.** Adaptación de la pirámide Socransky (colonización de bacterias en tejidos periodontales) para explicar los colonizadores en la película oral, primarios y tardíos. Los colores corresponden al estado de desarrollo de la placa microbiana siendo los grupos azul, morado y verde los primeros colonizadores y, gracias a estos, se asientan nuevas especies más patógenas, grupos amarillo y naranja. Cuanto más arriba de la pirámide nos encontramos estará más avanzada la enfermedad periodontal, siendo el rojo el más patógeno (111).

En circunstancias normales, la placa dental permanece relativamente estable, contribuyendo a la salud dental (105, 112). Existen varias hipótesis que explican cómo llegan a pasar de ese estado de salud a patología. Hay tres: la hipótesis de la placa no específica, la específica y la placa ecológica.

### **Hipótesis de la placa no específica y específica**

En la hipótesis de la placa no específica, descrita por Theliade, (113) la enfermedad se considera un resultado de la actividad general de toda la comunidad oral. El inicio y progresión de la enfermedad son el resultado del aumento de la placa más

allá de un umbral en el que las defensas del huésped ya no son capaces de neutralizar las bacterias de la placa y sus productos tóxicos (113, 114).

Al estudiar e identificar qué microorganismos están presentes en la enfermedad, se llegó a la propuesta de la hipótesis de la placa específica, descrita por Loesche (114, 115). Esta hipótesis afirma que sólo unas pocas especies de la placa dental están activamente involucradas en la enfermedad.

### **Hipótesis de la placa ecológica**

Por último, está la hipótesis de la placa ecológica. Esta teoría fue descrita por Marsh quien refiere que los organismos potencialmente patógenos pueden estar presentes en la salud, pero a niveles que no son clínicamente relevantes. Por tanto, la enfermedad es el resultado de un cambio en el equilibrio del huésped y su microflora (115-117). Este desequilibrio puede deberse a hábitos (fumar), cambios alimenticios (dietas ricas en azúcares) o enfermedades, como por ejemplo segregar poca saliva (Síndrome de Sjogren) (115-117).

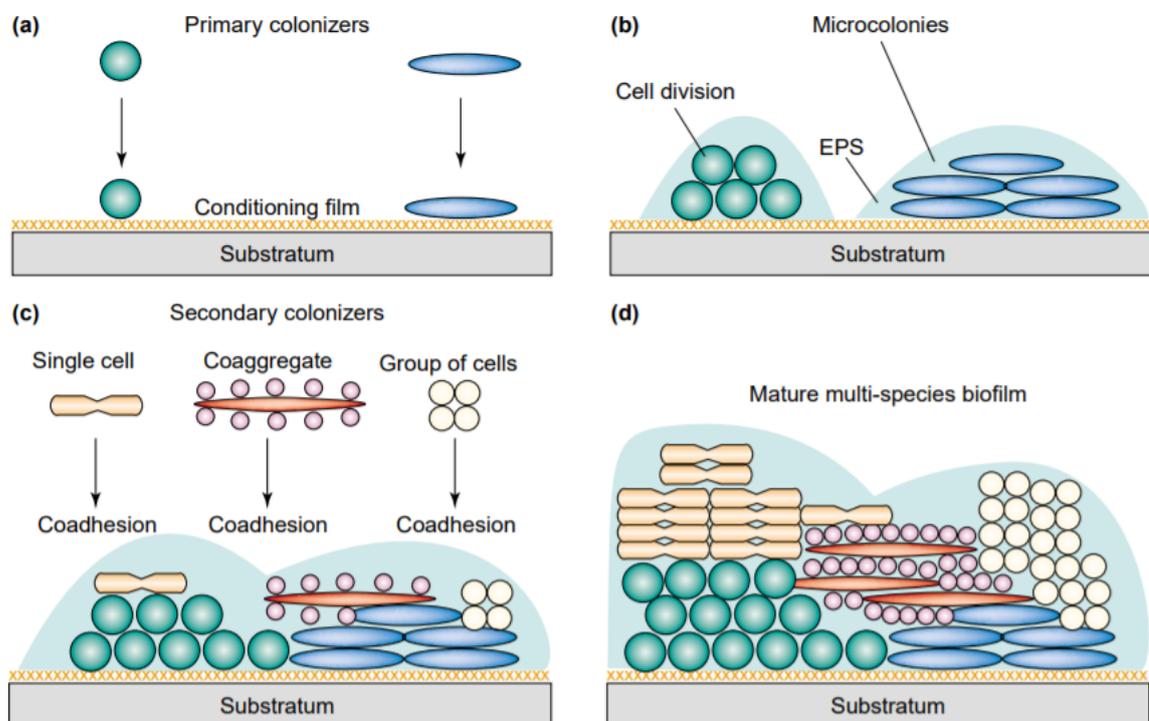
Estas condiciones interrumpen la homeostasis natural presente en la placa durante la salud, conduciendo a un ambiente de organismos que pueden causar enfermedades. Por ejemplo, una dieta rica en azúcar produce condiciones prolongadas de pH ácido. Este cambio ambiental en la placa dental favorece el crecimiento de bacterias tolerantes al ácido, que son capaces de desmineralizar el esmalte, siendo así la primera entrada para que otras bacterias colonicen y avancen dentro de las superficies hasta llegar a la pulpa (116, 117) (**Figura 28**).



**Figura 28.** Esquema de evolución de una caries hasta la afectación pulpar con lesión periapical. Imagen sacada de un cuadro en clínica odontológica.

## Biofilm

Las bacterias que colonizan la cámara pulpar y el interior de los conductos radiculares no suelen hacerlo de forma aislada, sino que lo hacen asociándose con otras bacterias formando una estructura compleja llamada biofilm (**Figura 29**) (105, 118).



**Figura 29.** Etapas en la formación de biofilm. Desde la llegada de colonizadores primarios (A), secundarios la organización establecida y la liberación y dispersión a otras regiones dentro de la superficie dental (C). Adaptación de la imagen Rickard y cols (119).

El biofilm bacteriano es una estructura en la que se asocian una o varias especies microbianas, que están incluidas en una matriz extracelular de polisacáridos secretada por ellas mismas. Estas asociaciones se constituyen por autoagregación o coagregación (118, 119).

## ***Formación del biofilm***

La manera en la que el biofilm se adhiere a los conductos radiculares es aún desconocida. La teoría más aceptada es la de Svensäter y Bergenholtz (110) que describe de 4 fases:

*“En la primera fase se forma una película adhesiva sobre la dentina promovida por el depósito de proteínas y otros compuestos derivados de las bacterias en suspensión, del proceso necrosis y/o inflamación, etc.*

*En la segunda, sobre esa película pegajosa, de todas las que están en suspensión se fijan algunas bacterias específicas con capacidad de adhesión.*

*En la tercera, la primera capa de bacterias ya adherida segrega mediadores que, por un lado, van fijando más y más bacterias, de esa estirpe o de otras, y por otro, va formando la matriz extracelular de polisacárido, (EPS) primera barrera defensiva característica del biofilm.*

*En la cuarta y última, el biofilm va madurando y creando sistemas de defensa más complejos. Al mismo tiempo, arroja bacterias al exterior que producen la respuesta inflamatoria del huésped“ (110,118, 119).*

Esta estructura es muy resistente gracias a esa matriz extracelular de polisacárido (**EPS**). La función primaria de la **EPS** es la protección. Actúa como una barrera impermeable para limitar la penetración de antimicrobianos (105, 118-120).

Esta protección es un obstáculo físico para la entrada y difusión de medicamentos antimicrobianos. Después de un tratamiento con antibióticos, las células de la parte superior de la **EPS** están más expuestas y pueden morir mientras que las bacterias localizadas en la parte profunda del biofilm pueden ser capaces de sobrevivir a estos tratamientos. Se ha demostrado que una bacteria asociada a un biofilm tiene una tolerancia entre 100 y 1.000 veces mayor a los antibióticos en comparación a ellos mismos en solitario (105, 117-120).

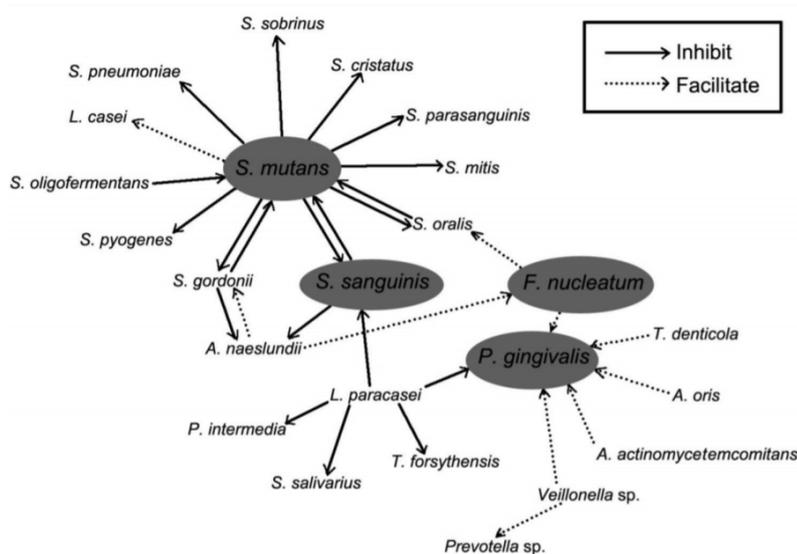
Aunque los antibióticos pueden disminuir la cantidad de bacterias dentro de un biofilm, el tratamiento puede no erradicarlo completamente, por lo tanto, puede ocurrir la aparición de infecciones refractarias/reincidentes. El biofilm representa

un modo de crecimiento protegido, ya que, aunque las capas externas puedan quedarse estables, puede haber proliferación y crecimiento en las capas profundas de otras especies de microorganismos y esto hace que puedan sobrevivir a la defensa inmunológica del huésped, todo esto presenta un verdadero desafío en el tratamiento endodóntico (105, 116-120).

### **Comunicación dentro del biofilm**

La forma de comunicación que tiene un biofilm es emplear diferentes lenguajes químicos. Las bacterias aprenden sobre su población celular actual y determinan cuándo han alcanzado una masa crítica. Utilizando esa información, las bacterias pueden modificar su comportamiento para llevar a cabo procesos que requerirían muchas células actuando en conjunto para ser más efectivos. La comunicación de célula a célula se lleva a cabo generalmente por medio de moléculas de señales difusas producidas y liberadas por las bacterias (121) (**Figura 30**).

Cuando las bacterias crecen dentro de un biofilm, secretan moléculas de señalización (**autoinductores**) que aumentan su concentración en función de la densidad celular bacteriana.



**Figura 30.** Interacción entre diferentes especies bacterianas. Las líneas continuas indican inhibición, mientras que las líneas discontinuas indican colaboración. La dirección de la flecha indica el sentido de la inhibición o la facilitación. Ruijie Huang y cols (121).

En un proceso llamado *percepción de quórum*, las bacterias se comunican entre sí mediante el uso de autoinductores para regular su expresión génica en respuesta a variaciones en la densidad de la población celular ya sea por crecimiento o por una agresión externa (121).

La expresión génica diferencial da como resultado la heterogeneidad dentro del biofilm. En las bacterias se reconocen dos tipos de sistemas de percepción de quórum: la comunicación intraespecífica y la comunicación entre especies. Durante la comunicación intraespecie en las Gram-negativas esta la N-acil homoserina lactona (AHL) y en las Gram-positivas principalmente péptidos (121, 122).

Durante la comunicación entre especies, las bacterias utilizan el autoinductor-2 (AI-2). Esto ocurre en una amplia variedad de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas; es el único autoinductor de la comunicación no específica. Por esta razón, la AI-2 se ha propuesto como la señal universal para la comunicación entre especies (122).

El biofilm de especies bacterianas presentes en un diente que necesite un tratamiento de endodoncia, puede estar condicionado por el momento en que se vaya a realizar. Cuanto más tiempo pase, es lógico pensar en un mayor crecimiento bacteriano y una mayor organización ya que el deterioro del complejo pulpar es mayor. A la hora de realizar una endodoncia pueden coexistir restos vitales con necróticos. En los retratamientos existirán infecciones persistentes con mucha más resistencia. Cuando se presentan pulpas vitales apenas se encuentran bacterias, esto es debido a que el biofilm bacteriano se desarrolla y tiene preferencia en tejidos necróticos (81, 120, 123).

Dentro de la flora oral en patología endodóntica, interesa conocer la microbiología de los tejidos necróticos e infecciones persistentes ya que son las que muestran mayor resistencia a su eliminación (81). Las causas de un fracaso endodóntico son la presencia, persistencia, multiplicación y migración de bacterias en los conductos radiculares hacia los tejidos periapicales (81).

Es por ello por lo que hay que poner especial atención en la irrigación, ya que es la que va a tener efecto antimicrobiano y va acceder a las zonas más complejas

dentro del sistema de conductos que evitará que queden colonias residuales que vuelvan a proliferar (120).

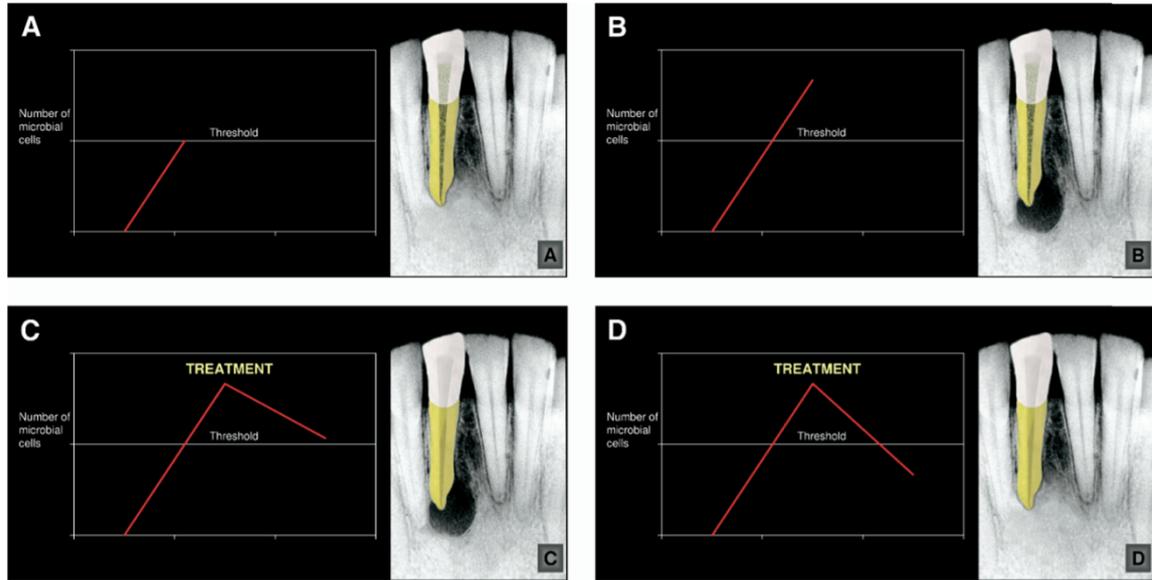
Existen diferentes tipos de especies bacterianas presentes en los fracasos de endodoncia con infecciones recurrentes. Siqueira y Cols (81) diferencian varias fases en las que recoger la muestra para la posterior identificación bacteriana y según en qué momento las recojamos, las especies bacterianas pueden variar. Hay tres 3, una muestra recogida antes de comenzar la obturación, otra entre sesiones de endodoncia con medicación intraconducto y por último muestras recogidas en dientes con fracaso endodóntico.

Las dos primeras corresponden a bacterias presentes en los conductos mientras que la segunda pertenece a bacterias persistentes, es decir una vez terminado el tratamiento endodóntico. Estas segundas, son bacterias más resistentes que han conseguido sobrevivir y volver a desarrollarse para acabar produciendo infecciones (123).

Se entiende que la desinfección total y completa del sistema de conductos radiculares no es posible. Por lo tanto, se acepta que habrá una cantidad de colonias residuales que pueden quedar o sobrevivir dentro del sistema. Estas colonias, si se encuentran en una proporción muy baja o aislada gracias o bien a la región anatómica en la que se hayan quedado o a la obturación no deberían ocasionar clínica. Se entiende por tanto que es a partir de una cierta cantidad de estas colonias que pueden provocar infecciones posteriores (81).

Es necesario trabajar lo suficiente y reducir el número de colonias a unas cifras por debajo de un umbral que hará muy difícil una posible recidiva (**Figura 31**).

Estas colonias de bacterias que pueden sobrevivir se deben a varias causas. La dificultad que presenta el sistema de conductos para su desinfección, la capacidad de algunas bacterias de penetrar en las zonas más profundas de los túbulos dentinarios hace que sea más difícil acceder a ellas, la resistencia de las propias bacterias por su morfología y la capacidad de estas a sobrevivir a diferencias o cambios en el medio que les rodea (123, 124).



**Figura 31.** Explicación de la afectación clínica que puede dar un diente en función del número de colonias que tengamos. Siempre que esté por encima del umbral (threshold) dará clínica o recidiva, imágenes (B) y (C), si no hay bacterias que lleguen al nivel no habrá patología (A) y si realizamos el tratamiento y reducimos las bacterias por debajo del umbral habrá curación (D). Siqueira y cols (81).

Estas colonias que han conseguido resistir y posteriormente ocasionar fracasos endodónticos, se han podido detectar gracias a diferentes medios de identificación bacteriana como son los métodos de cultivo y de pirosecuenciación (81).

### ***Enterococcus faecalis***

De estas especies bacterianas que se han aislado de manera individual, la que aparece con mayor frecuencia es el *Enterococcus faecalis*, (125) que es una bacteria Gram-positiva anaerobia facultativa, catalasa negativa y perteneciente a la familia de los *Enterococcaceae* (126).

La familia *Enterococcaceae* fue descrita por primera vez en 1899 (126). Inicialmente se encontraban clasificadas como *Streptococcus* del grupo D de la clasificación antigénica de Lancefield (127) (Figura 32). Este sistema fue creado por Rebecca Craighill Lancefield, una clasificación serológica de los *estreptococcus*  $\beta$  hemolíticos. Los *Enterococcaceae* han permanecido en ese grupo hasta hace

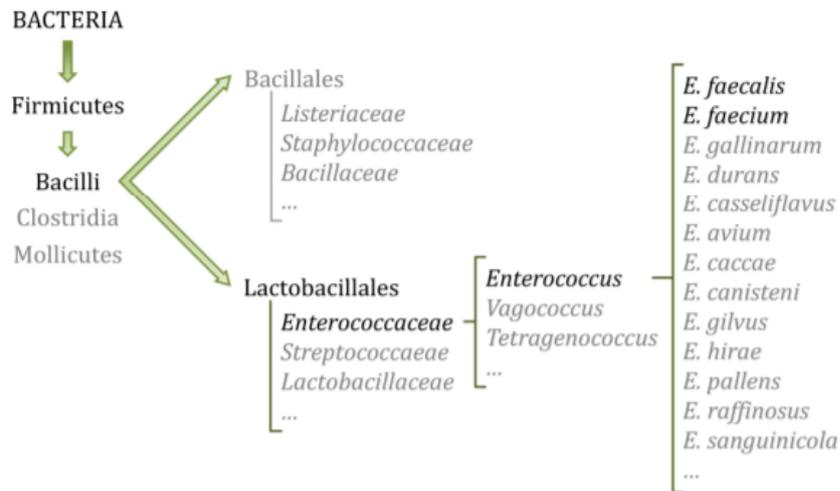
apenas 30 años, cuando fueron diferenciadas de estos en base a estudios de ADN (127, 128).

Grupo Lancefield	Especies representativas	Infecciones típicas
A	<i>S.pyogenes</i>	Faringitis, celulitis fiebre escarlatina.
B	<i>S.agalactiae</i>	Sepsis neonatal, meningitis, infección vías urinarias, endocarditis.
C,G	<i>S.dysgalactiae, equismilis</i>	Celulitis, bacteriemia, endocarditis.
D	<b><i>E.faecalis</i></b> , <i>E.faecium</i> , <i>S.bovis</i>	Infecciones vías urinarias, bacteriemia, endocarditis.
Variable o no grupo	<i>E.viridians</i> , <i>S.mitis</i> , <i>S.intermedius,anginosus</i> , <i>S.constellatus</i> .	Endocarditis, absceso dental, absceso cerebral, sinusitis, neumonía.

**Figura 32.** Clasificación de Lancefield con los grupos y especies más representativas, el grupo D corresponde a *E.faecalis* (128).

La familia *Enterococcaceae* pertenece al *phylum Firmicutes* y clase *Bacilli*, junto con *Lactobacillae*, *Streptococcaceae* y otras familias (126).

Hoy en día, el número de especies incluidas dentro de *Enterococcus*, el principal género de la familia *Enterococcaceae*, está aumentando rápidamente, en parte gracias a técnicas de identificación genómicas avanzadas. Las dos de mayor relevancia por su importancia en patología dental son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (**Figura 33**).



**Figura 33.** Clasificación taxonómica del género *Enterococcus*. Se incluyen las dos especies más relevantes así como otras ocasionalmente descritas como patógenos humanos (126).

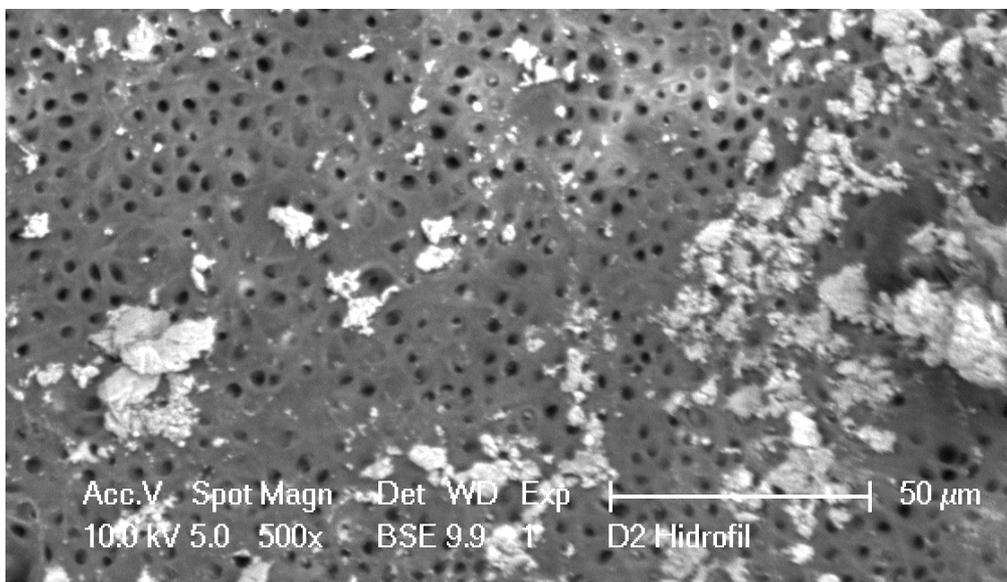
Los *Enterococcus* se pueden encontrar en el sistema digestivo de una gran variedad de animales. También se han aislado en el suelo o en el agua, aunque no son sus hábitats naturales por lo que la presencia de ellos puede indicar contaminación (129).

El *Enterococcus faecalis* es una bacteria comensal, que se encuentra en el intestino y en el tracto genital femenino (126). Puede formar biofilm por sí mismo sin asociación de otras bacterias (126). George y cols (130) analizaron la estructura del biofilm de *E. faecalis*. En ella observaron que esta estructura se comportaba de manera diferente en función del medio que le rodeara, aerobio o anaerobio. En presencia de condiciones predominantes anaerobias, es cuando presenta un mayor grado de madurez y organización, formando formas de champiñón (130, 131). Sin embargo, cuando el medio era rico y aerobio, formaban mayor cantidad de biofilm, pero menos organizados y presentaban estructuras con mayor tendencia a colonizar los túbulos dentinarios (131).

El biofilm de *E. faecalis* por tanto, que crece en medios menos favorables con pocos nutrientes y presenta un menor número de bacterias que en medios ricos, aumentan el ratio calcio/fósforo en suspensión y degradan más la dentina que les rodea (132), por lo que se cree que, en esas circunstancias de supervivencia

compleja, estos biofilms tienden a calcificarse para aumentar sus defensas y ser más resistentes (133). Estos hallazgos se podrían resumir en que las bacterias que se encuentran en ambientes ricos (aerobios) están más predispuestas a procrear e invadir y en ambientes pobres (anaerobios) a defenderse y resistir (134).

Además, el *E. faecalis*, está capacitado para sobrevivir a condiciones desfavorables y cambios extremos en el entorno. Se ha visto que pueden resistir variaciones de pH de 12 hasta 6,9, a desinfectantes como metales pesados y alcohol y a altas temperaturas (60º) durante 30 minutos (126). Suelen vivir en abundantes colonias, formando unidades (CFU) de 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> CFU/mL (126). Todo esto hace del *E. faecalis*, un reto en los protocolos de desinfección en endodoncia (**Figura 34**).



**Figura 34.** Colonias de *Enterococcus faecalis* adheridas a las paredes de la superficie del canal radicular presentes también en los túbulos dentinarios imagen de microscopía SEM tomada en el campus de la Universidad San Pablo CEU Monte Príncipe.

# **JUSTIFICACIÓN**

A la vista de la evidencia científica planteada en esta introducción cabe plantear una serie de alternativas.

Lo primero es que no hay un consenso establecido sobre los protocolos de irrigación en Endodoncia tanto in vitro como en clínica. Tras el último metaanálisis publicado en 2019 sobre activación en la irrigación, se ve en muchos artículos la carencia de datos que no permiten aunar los diferentes protocolos. Se encuentra mucha variabilidad entre diferentes autores, ya que influyen muchos factores que hay que tener en cuenta. Entre los más importantes se describen: el uso de uno o varios irrigantes y el tipo de diente que se está tratando. No es lo mismo tratamientos sobre dientes uniradiculares que suelen tener mayor facilidad a la hora de instrumentar e irrigar las superficies, que la complejidad de premolares o molares. Las raíces mesiovestibulares de molares superiores o raíces mesiales de molares inferiores o la variedad en la anatomía de los premolares dificultan el tratamiento. La mayoría de los autores optan por conductos uniradiculares o no especifican el tipo de diente que escogen, al igual que no determinan la longitud de raíz trabajada. Tampoco se expone en algunos artículos el tamaño muestral, ni tampoco los tiempos de irrigación por ciclo de activación. En cuanto a los ciclos de activación, hay variedad de tiempos, desde ciclos de un minuto continuo a ciclos intermitentes de 30, 20 o 10 segundos alternando y renovando el irrigante. Renovar el irrigante durante los ciclos de activación se ha demostrado que tiene una mayor eficacia sobre una activación continua. Hemos querido en este estudio documentar todos estos datos que ayuden a colaborar en la formación de un protocolo de irrigación final para estudios in vitro.

Sigue sin haber una aceptación clara sobre la capacidad antimicrobiana del EDTA. Con este estudio se pretende observar qué efecto tiene la irrigación únicamente con EDTA y compararlo con otros irrigantes que presentan una actividad antimicrobiana ya establecida, es decir, si tiene capacidad por sí mismo o necesita de otros irrigantes complementarios o directamente se debe descartar para reducir los niveles bacterianos. También se va a analizar si el EDTA, en combinación con el hipoclorito de sodio puede alterar las propiedades antimicrobianas del NaOCl, ya que es el irrigante principal en endodoncia.

La activación del irrigante con la lima XP Endo finisher (XPF) es un método de activación novedosa que se emplea principalmente en protocolos de irrigación final, la mayoría de los estudios optan por una activación ultrasónica, no habiendo mucha evidencia respecto a este tipo de activación. Al introducirla en este estudio, se verá si es un sistema válido en protocolo de irrigación final y si se puede plantear como una alternativa a la activación ultrasónica pasiva (PUI).

También se va a comparar la eficacia de otro quelante, el ácido etidróico (HEDP) que puede servir como alternativa al EDTA, asociándolo al hipoclorito de sodio y viendo si afecta o no la capacidad antimicrobiana del hipoclorito. Hay pocos estudios publicados, pero se presenta como una buena alternativa y la combinación con el NaOCl parece óptima.

Por último, se ha creado un sistema robusto en la formación, inoculación y adherencia de biofilm de *Enterococcus faecalis* a las superficies dentinarias, lo que puede ayudar en trabajos posteriores a la hora de estudiar esta bacteria en futuros tratamientos.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La **hipótesis nula** (H0) de este estudio in vitro es que los quelantes **EDTA** y **HEDP** no tienen capacidad antimicrobiana cuando son activados solos o en combinación de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5,25%.

La **hipótesis alternativa** (Ha) es que es posible mejorar el tratamiento convencional mediante el uso de la activación de **EDTA** en el tratamiento endodóntico tanto activado con activación ultrasónica pasiva (**PUI**) como con lima Endo-XP finisher (**XPF**).

### **Objetivo general**

Determinar la eficacia antibacteriana del **EDTA** activado mediante **PUI** y **XPF** tras la finalización de la biomecánica, en presencia de biofilm maduro de *E. faecalis*.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la eficacia bacteriana del **EDTA** al 17% activado comparado con el **HEDP**.
- Determinar la eficacia bacteriana del **EDTA** al 17% activado con NaOCl al 5,25%.
- Determinar si el **HEDP** es una mejor alternativa al **EDTA**, al combinarlo con el NaOCl al 5,25%.
- Determinar si hay diferencia entre la activación **PUI** y la activación **XPF**.
- Determinar la eficacia de los diferentes irrigantes frente a biofilm maduro de *E. faecalis*.

# **MATERIAL Y MÉTODO**

Este estudio experimental in vitro, valora la combinación de dos quelantes con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5,25% en protocolos de irrigación final, es decir, después de la instrumentación biomecánica. Se realiza en dientes permanentes humanos adultos infectados con una cepa de *Enterococcus faecalis*. Los irrigantes que se activan en el protocolo de irrigación final se dividen dos grupos. En el primer grupo es activado con la lima XP Endo finisher (XPF) y el segundo grupo es activado con activación ultrasónica pasiva (PUI) para realizar una comparativa en la eficacia de ambos instrumentos de activación.

Una vez activada cada muestra, se analizan resultados a las 24-48 horas para después evaluar la capacidad antimicrobiana que presenta cada uno de ellos contra biofilm maduro de *Enterococcus faecalis*.

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de ética de la Universidad San Pablo CEU 341/19/15. La duración del estudio fue de dos años y medio. Todo el material utilizado en los estudios fue esterilizado en autoclave o desinfectado manualmente para prevenir la contaminación externa.

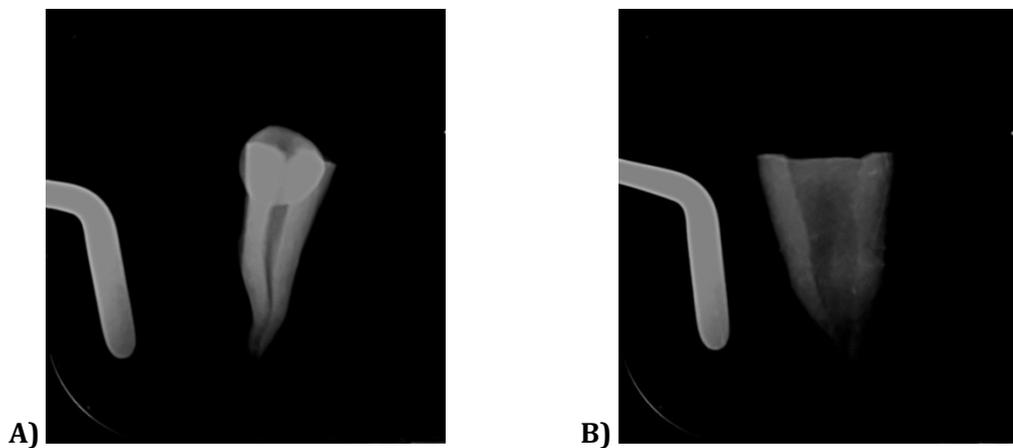
### **Selección de dientes y preparación de raíces**

Se escogieron dientes permanentes, tanto uniradiculares como multiradiculares. Las muestras fueron facilitadas por varias clínicas odontológicas de ámbito privado. Los criterios de inclusión fueron: dientes sin tratamiento endodóntico previo, sin alteraciones anatómicas radiculares, que no presentaran reabsorciones y que tuvieran el ápice completamente desarrollado.

A cada diente se le amputó la raíz con un disco de 32 mm de fibra de vidrio reforzado para pieza de mano marca Dremel, dejando una longitud media de 17mm. Posteriormente cada raíz se barnizó con laca de uñas para simular las condiciones del periodonto y sellarlas del exterior para evitar contaminación externa. Se tomaron dos radiografías periapicales previas al tratamiento, una en sentido mesio-distal y otra vestíbulo-lingual para ver las características anatómicas y que cumplieran todos los criterios de inclusión (**Figuras 35 y 36**).



**Figura 35.** Grupo de raíces, ya seccionadas y divididas por compartimentos en los laboratorios de la Universidad San Pablo CEU de Montepríncipe.



**Figura 36.** Radiografías tomadas de una muestra en sentido mesio-distal (A) y vestibulo-lingual (B). Se colocó un instrumento metálico al lado de cada radiografía para tener referencia.

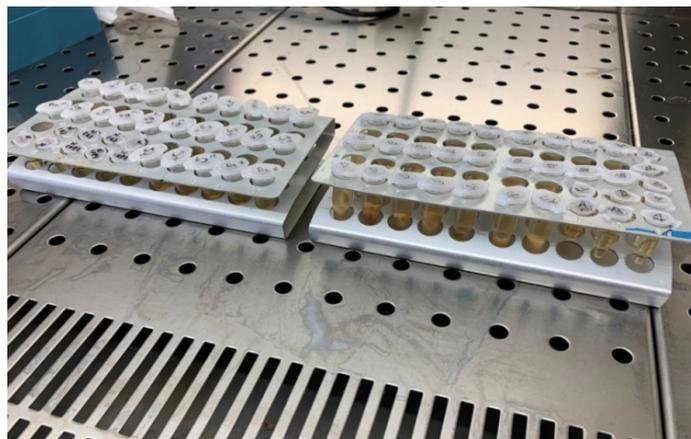
Una vez se seccionaron las raíces se realizó la biomecánica del conducto radicular. Primero se permeabilizaron las raíces con limas 10 y 15 k-file y después se instrumentaron con la lima wave One Gold Primary, en un motor de endodoncia VDW Silver Reciproc, conservando siempre el patency apical con lima 10 (**Figura 37**).



**Figura 37.** Laboratorio donde se instrumentaron las muestras en la Universidad San Pablo CEU de Montepríncipe.

## Individualización de muestras

Cada muestra se individualizó en un tubo Eppendorf. Se añadió a cada tubo 500 microlitros de medio de cultivo BHI. Se introdujeron las raíces dentro de cada tubo con la apertura coronal boca arriba para facilitar su posterior inoculación. Todo el trabajo se realizó en campana biológica (**Figura 38**). Una vez individualizadas las muestras, se llevaron al autoclave y se esterilizaron a 121° 1atm 20 minutos.

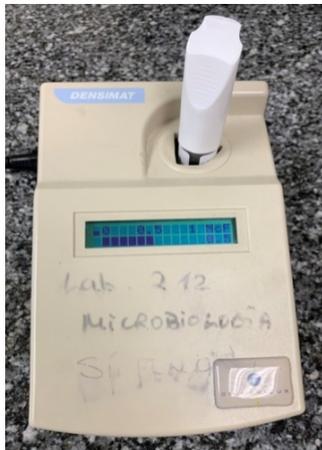


**Figura 38.** Imagen tomada de una serie de muestras en campana, para su esterilización y posterior inoculación.

## Preparación de Biofilm e inoculación

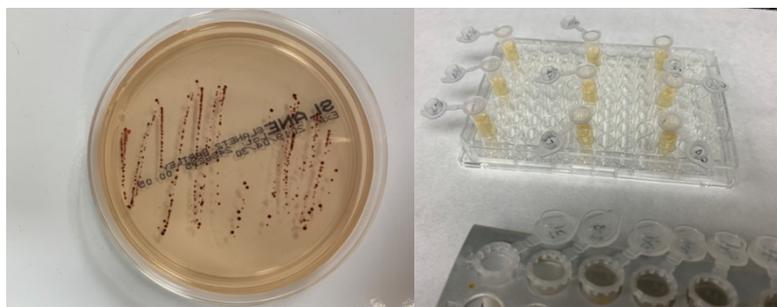
La cepa de *Enterococcus faecalis*, CECT 481, fue facilitada por la Universidad Complutense de Madrid. Se realizó un pase sobre la placa base a una placa de cultivo Slanetz-Bartley con ázida sódica 24 horas antes para tener las colonias en actividad de crecimiento.

El inóculo se preparó añadiendo colonias con un asa de siembra de esta placa, a un tubo con 3 mL de suero fisiológico hasta conseguir una turbidez 0,5 McF (**Figura 39**). Posteriormente se obtuvieron 50 microlitros de esta preparación para inocular cada una de las raíces.



**Figura 39.** Turbidímetro para graduar la concentración de 0.5 McF del tubo de ensayo.

La inoculación dentro de cada raíz se realizó colocando la punta de la pipeta dentro del conducto radicular. Una vez inoculadas todas las muestras se dejaron 2 semanas a temperatura estufa de 37° C (**Figura 40**).



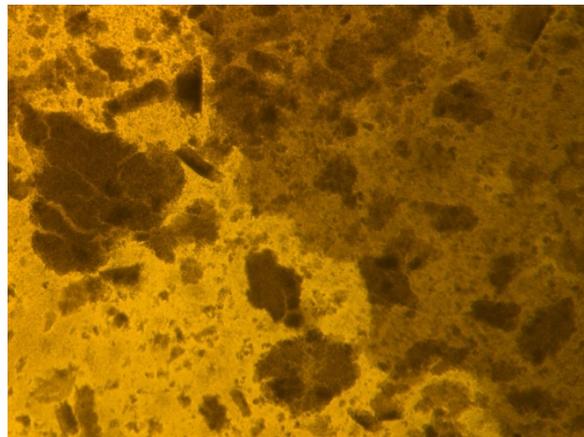
**Figura 40.** Pase del cultivo de la muestra congelada, resultado obtenido a las 24 horas. en placa de Slanetz-Bartley con sal de tretazolio que permite teñir las colonias para facilitar el conteo.

Previamente a la distribución de los grupos, se realizaron varios ensayos en bases de pocillos de 12. En estas placas, se organizaron de tal manera que hubiera en cada pocillo un volumen total de 3 mL, de los cuales 2,5 corresponderían a medio BHI y 0,5 de solución de bacteria 0,5 McF.

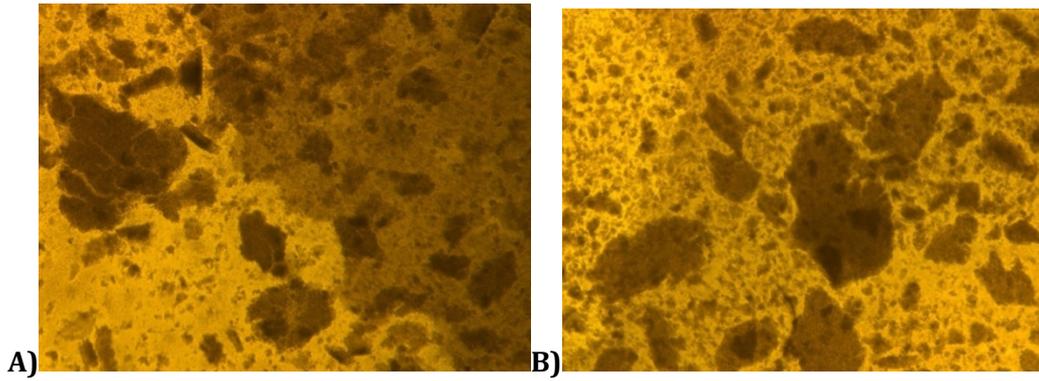
Las placas se dejaron de manera aleatoria en varios tiempos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas, empleándose sabanillas para evitar contaminación cruzada, tanto con los controles como con los pocillos de trabajo.

Se introdujeron los irrigantes con una jeringa convencional de 3mL de salida lateral sin activación alguna. Los irrigantes que se emplearon fueron NaOCl al 5,25%, NaOCl al 3%, EDTA al 17%, una combinación de EDTA al 17% y NaOCl 5,25% y HEDP combinado con NaOCl 5,25%.

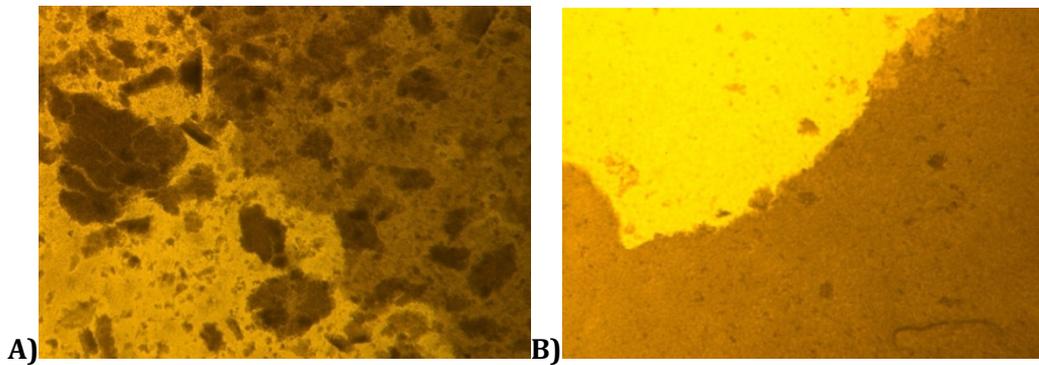
A las 48 horas se analiza los resultados bajo microscopía (**Figuras 41-44**). En todos los pocillos con NaOCl independientemente de la concentración, hubo eliminación total de bacterias. Sí quedaron sin embargo bacterias en los grupos con EDTA. Esto hizo que descartáramos grupos con NaOCl únicamente, ya que en estos ensayos tuvimos una eliminación bacteriana total o niveles por debajo de detección.



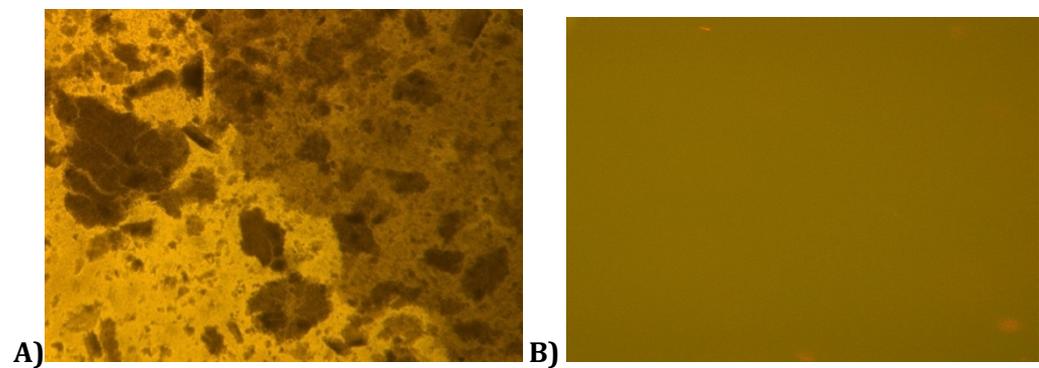
**Figura 41.** Imagen a 2 semanas de un pocillo control donde no se aplicaría irrigante alguno.



**Figura 42.** (A) Imagen a 2 semanas de un pocillo control donde no se aplicaría irrigante alguno. (B) Imagen a las 48 horas pasadas dos semanas de un pocillo que se irrigó con EDTA, habiendo dejado las placas dos semanas en estufa.



**Figura 43.** (A) Imagen a 2 semanas de un pocillo control donde no se aplicaría irrigante alguno. (B) Imagen a las 48 horas pasadas dos semanas de un pocillo que se irrigó con EDTA y NaOCl al 5,25%, habiendo dejado las placas dos semanas en estufa.



**Figura 44.** (A) Imagen a 2 semanas de un pocillo control donde no se aplicaría irrigante alguno. (B) Imagen al microscopio 48 horas pasadas dos semanas tras aplicar un contraste de pocillo con NaOCl al 5,25%.

Se establecieron dos semanas como el tiempo óptimo de incubación en estufa antes de realizar el tratamiento, ya que en menos tiempo se observó una maduración insuficiente del biofilm. Pasadas las dos semanas, algunos pocillos perdían medio de cultivo por evaporación, esto era más acusado en los pocillos de los laterales y de las esquinas que llegaban incluso a secarse por completo. Para intentar paliar esto, se recurrió a añadir medio de cultivo BHI cada semana, pero pese a tener todas las precauciones la contaminación cruzada entre pocillos era frecuente.

### **Selección de grupos y aplicación de tratamiento**

Una vez pasadas dos semanas, cada raíz se distribuyó de manera aleatoria en los diferentes grupos, basados en estudios previos y la variabilidad de estos. Cada grupo principal tiene un tamaño muestral de 20(n=20) (**Figura 45**). La irrigación de los grupos fue realizada con jeringa 3 mL monoject con aguja de salida lateral, en ciclos de 20 segundos durante un minuto.

En el primer grupo se utilizó de irrigante el quelante fuerte, EDTA; con una concentración de 17%. En el segundo grupo se usó el quelante débil, HEDP, el cual se preparó según indicaciones del fabricante; esto es, cada cápsula de HEDP se diluye en 10mL de NaOCl con una concentración de 5,25%. En el tercer grupo se combinó el EDTA al 17% con NaOCl al 5,25%. En el cuarto grupo se empleó un irrigante neutro, PBS; el quinto grupo fue el control positivo donde no se empleó ni irrigante ni tratamiento alguno.

Cada grupo principal (n=20), fue dividido en dos subgrupos con un tamaño de muestra 10 (n=10), según la activación del irrigante se hiciera mediante activación ultrasónica pasiva (PUI) o activación mediante la XP-Endo finisher (XPF).

La PUI se hizo con un aparato de ultrasonidos, DTE D5 ultrasonic piezo scaler, a una velocidad de 1 con una punta ultrasónica de irrigación Irrisafe 20/21.

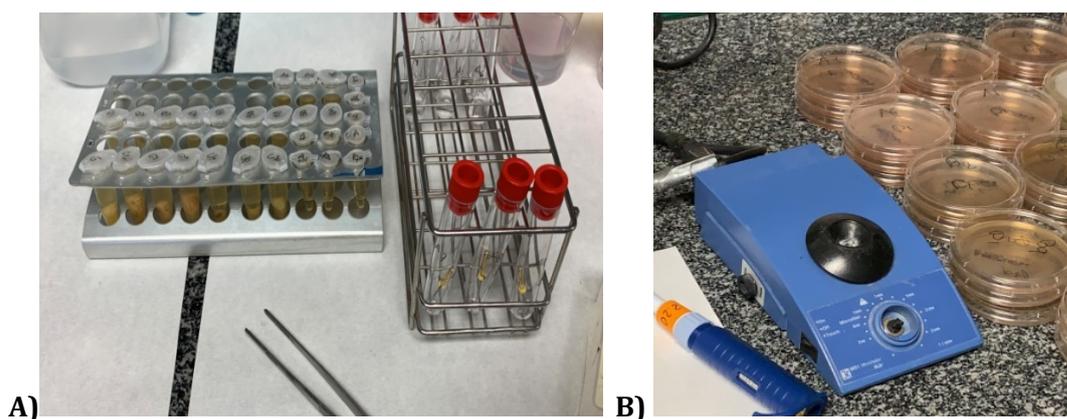
La activación de la XPF fue aplicada con la fuerza y torque descrita por el fabricante, con motor de endodoncia VDW silver reciproc a 800rpm.

		Número de muestras (n:100)		
Control (n:20)	PBS (n:20)	EDTA (n:20)	HEDP + NaOCl (n:20)	EDTA + NaOCl (n:20)
No tto.	PUI (n:10)	PUI (n:10)	PUI (n:10)	PUI (n:10)
	XPF (n:10)	XPF (n:10)	XPF (n:10)	XPF (n:10)

**Figura 45.** Esquema de la distribución de las muestras por grupos. En el grupo control no hubo tratamiento (tto) alguno.

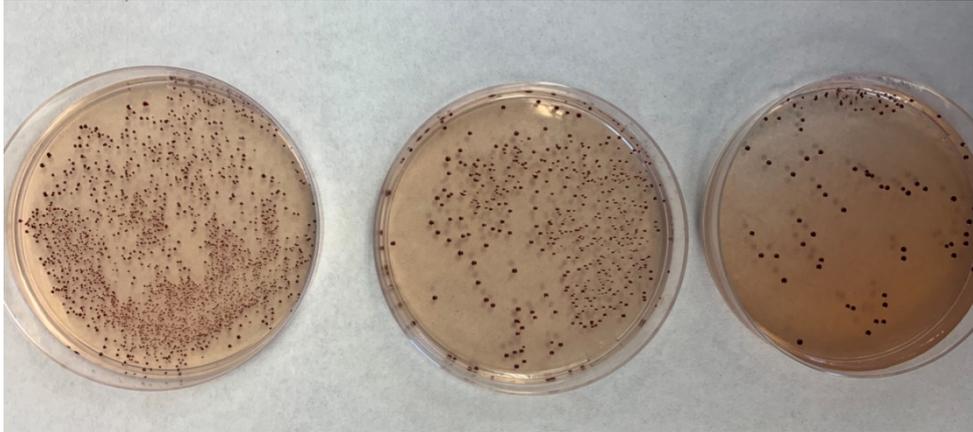
### Obtención y recogida de muestras

Terminado el tratamiento en todos los grupos, se tomó cada muestra de su Eppendorf y se obtuvo dentina del tercio apical con una lima rotatoria SX Protaper, introducida por el foramen apical a una profundidad de 3mm. La muestra se colocó encima de tubos de ensayo donde iba depositando la dentina extraída. La cantidad de dentina extraída por muestra fue de 15 mg (**Figura 46**).



**Figura 46.** (A) Imagen de los Eppendorfs y los tubos donde se introduce la dentina. (B) Imagen del vórtex.

Esta dentina introducida en los tubos de ensayo, cuyo volumen era de 1000 microlitros de PBS, se agitó en un Vórtex durante 1 minuto para conseguir que las bacterias adheridas pasaran al medio. Posteriormente se realizaron 3 diluciones de factor 10 en tubos Eppendorfs, con un volumen de 500 microlitros cada uno (**Figura 47**).

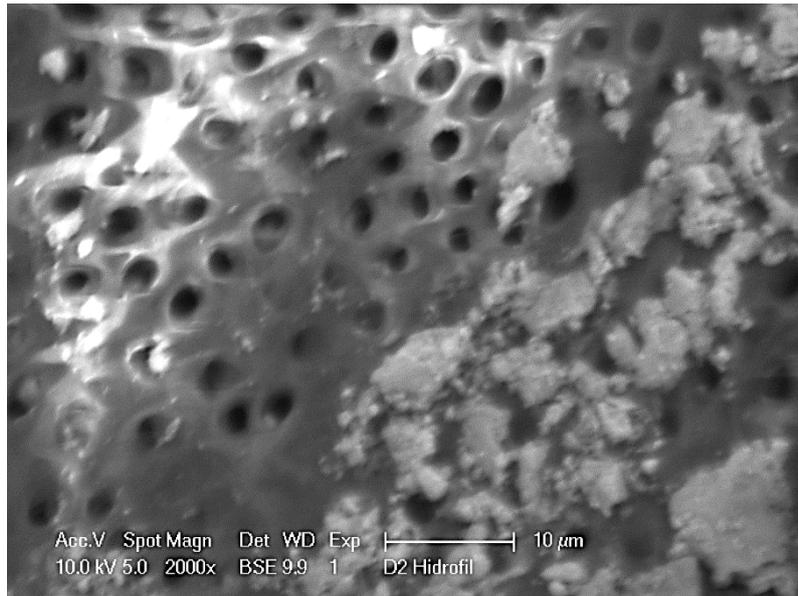


**Figura 47.** Muestra de control con 3 diluciones, en placa de Slanetz-Bartley con sal de tetracizolio que permite teñir las colonias para facilitar el conteo.

De cada tubo de dilución se obtuvieron 100 microlitros y se llevaron a placas de cultivo Slanetz Bartley, con ázida de sodio al 1%, específica para *Enterococcus faecalis*, en las que se sembraron con asas de barrillo alrededor de toda la placa.

A las 48 horas se recogieron las placas para ver los resultados. Se observó que las colonias tenían un crecimiento más lento que cuando se realizó el pase para obtener la bacteria en fase de crecimiento, por lo que hubo que dejar 48 horas en vez de 24, para proceder al conteo de las colonias (CFU) mediante numeración visual.

Las raíces del control positivo se seccionaron longitudinalmente y se cubrieron con líquido iónico para poder ser observadas en el microscopio electrónico de barrido SEM y poder constatar visualmente la formación de biofilm dentro del conducto (**Figura 48**).



**Figura 48.** Muestra de control positivo donde se puede ver la adherencia del biofilm en los túbulos dentinarios. Imagen tomada en la Universidad San Pablo CEU.

Los parámetros morfológicos de las raíces se obtuvieron a partir de las imágenes radiográficas mediante un script desarrollado bajo la aplicación Fiji.

### **Análisis estadístico**

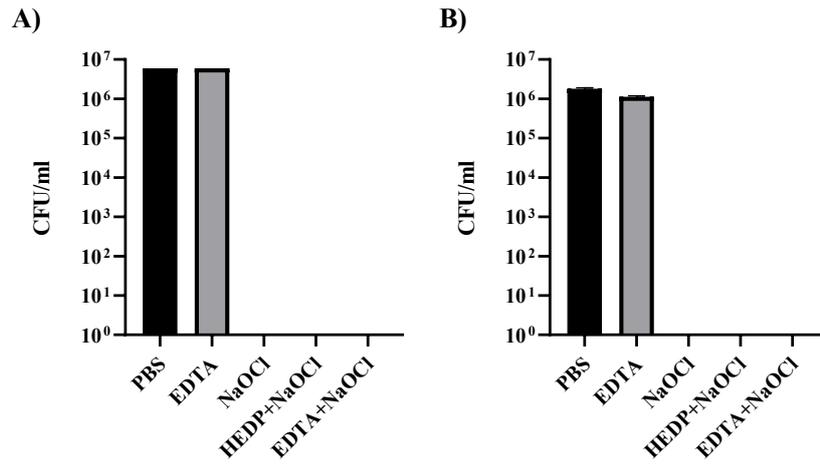
El análisis estadístico de los distintos grupos experimentales se realizó mediante el test de **Kruskal-Wallis** para ver diferencias entre los grupos. Para analizar la diferencia entre pares se ha recurrido al test de **Wilcoxon**. Se emplearon test no paramétricos por las grandes asimetrías y colas que presentaban los resultados dentro de cada grupo.

# **RESULTADOS**

El *Enterococcus faecalis* puede utilizarse como una bacteria modelo para estudiar la biopelícula formada en los conductos radiculares. Con el fin de caracterizar el comportamiento de la bacteria utilizada en nuestros estudios, inicialmente se probó el efecto de los diferentes irrigantes que se iban a utilizar en nuestro estudio. En la **Figura 49A**, se incubaron  $5 \times 10^6$  UFC de *E. faecalis* durante 1 minuto en 1ml de los diferentes irrigantes estudiados. Se puede apreciar que cualquiera de las condiciones que contienen NaOCl fue suficiente para eliminar todas las bacterias vivas del inóculo. Sin embargo, el tratamiento con EDTA no causó ningún efecto en *E. faecalis*.

Con el fin de estudiar el efecto de los irrigantes en la biopelícula de *E. faecalis*, se desarrolló un método para generar biopelícula en placas de cultivo de tejidos cultivando una preparación de 0,25 McF de *E. faecalis* en 1ml de medio de BHI líquido en pozos independientes de una placa de cultivo de tejidos de 12 pozos. Después de la inoculación, la placa se selló con parafilm para evitar la desecación y establecer condiciones.

Se analizó la resistencia del biofilm maduro de *E. faecalis* frente a los diferentes irrigantes de desinfección (**Figura 49B**). Después de dos semanas de incubación, se recuperaron las biopelículas individuales de los pozos de cultivo de tejidos, tratándose de minimizar la fragmentación. Las biopelículas se colocaron en tubos Eppendorf individuales y se dejaron depositar en el fondo. Los medios de la parte superior se retiraron antes de ser expuestos a los diferentes irrigantes durante 1 minuto. Los irrigantes desinfectantes se retiraron posteriormente y la biopelícula fue destruida por un intenso pipeteo. Las bacterias resuspendidas se lavaron 3 veces con PBS antes de las diluciones seriadas requeridas para la titulación en los medios de Slanetz-Barley. No se pudo recuperar ni una sola colonia de los cultivos tratados con NaOCl solo o en combinación con otras sustancias.



**Figura 49.** Efecto de la desinfección de los irrigantes contra *E. faecalis* in vitro. Resultados de las pruebas de los irrigantes contra las bacterias **(A)** y contra la biopelícula madura **(B)**. En ambos casos, no se detectaron bacterias en los tratamientos con irrigantes donde hubo NaOCl.

Una vez tomada estas referencias in vitro procedemos a explicar los resultados obtenidos sobre las muestras dentales con los diferentes irrigantes.

### Resultados del primer grupo, EDTA

Las muestras del primer grupo tratado con el quelante fuerte EDTA, mostraron una media de colonias de 1.68E+02. La comparación con el grupo control, que tuvo una media de 4,45E+03, sugiere un descenso de bacterias estadísticamente significativo. Sin embargo, la presencia de colonias es suficientemente alta como para poder considerarlo una alternativa en el tratamiento de desinfección del conducto radicular. Por otro lado, la comparación entre los subgrupos de XPF y PUI apenas tiene diferencias significativas entre ellos, siendo de 1,96 XPF frente a 1,43 del PUI. Por lo que las dos activaciones tuvieron el mismo efecto, siendo ligeramente las muestras tratadas con PUI. Por lo tanto, la irrigación únicamente con EDTA no se puede considerar una alternativa de irrigante único en protocolo de irrigación final. A continuación, la tabla con las medias del grupo del EDTA **(Tabla 1)**.

Medias por grupo	Peso Inicial. mg	Peso Final. mg	Peso Dent.mg	CFU/(ml mg)
Control	4,2146	4,228	13	4,45E+03
XPF	4,2153	4,2268	11,5	1,96E+02
PUI	4,1891	4,2009	11,8	1,43E+02
Grupo total EDTA	4,2016	4,2133	11,5	1,68E+02

**Tabla 1.** Medias por grupo del EDTA. La primera columna correspondería al peso inicial medio de cada muestra, la segunda una vez extraída la dentina y la siguiente sería las medias de dentina obtenida por subgrupo. Por último, el recuento de bacterias medio según la forma de activación y grupo.

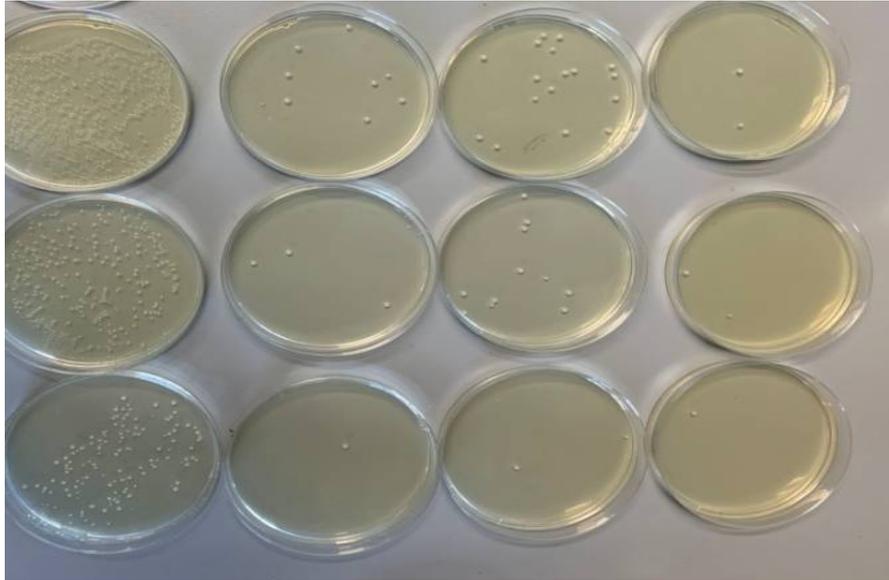
Los números individuales de cada muestra en el grupo de EDTA fueron los siguientes (**Tabla 2**).

Raíz	CFU	Tratamiento	Irrigante	Peso Inicial.mg	Peso Final.mg	Peso Dent.mg	CFU/(ml mg)
B2	80000	Pos	Ctrl	4,2357	4,2529	17,2	4,7E+03
B4	40000	Pos	Ctrl	4,1935	4,2031	9,6	4,2E+03
B7	700	XPF	EDTA	4,2068	4,2161	9,3	7,5E+01
B8	3300	XPF	EDTA	4,2376	4,254	16,4	2,0E+02
B9	100	XPF	EDTA	4,2297	4,2374	7,7	1,3E+01
C1	4800	XPF	EDTA	4,2529	4,2623	9,4	5,1E+02
C2	2200	XPF	EDTA	4,135	4,1542	19,2	1,1E+02
C3	100	XPF	EDTA	4,2514	4,2665	15,1	6,6E+00
C4	4000	XPF	EDTA	4,2454	4,26	14,6	2,7E+02
C5	500	XPF	EDTA	4,2533	4,2597	6,4	7,8E+01

C6	1800	XPF	EDTA	4,26	4,2712	11,2	1,6E+02
C7	5000	XPF	EDTA	4,0239	4,0322	8,3	6,0E+02
E4	1100	XPF	EDTA	4,2726	4,2808	8,2	1,3E+02
A1	800	PUI	EDTA	4,2101	4,2159	5,8	1,4E+02
A2	0	PUI	EDTA	4,2405	4,2477	7,2	0,0E+00
A3	1500	PUI	EDTA	4,2405	4,2557	15,2	9,9E+01
A4	2000	PUI	EDTA	4,0187	4,0325	13,8	1,4E+02
A5	100	PUI	EDTA	4,255	4,2623	7,3	1,4E+01
A6	200	PUI	EDTA	4,242	4,255	13	1,5E+01
A7	4000	PUI	EDTA	4,0193	4,034	14,7	2,7E+02
A8	5800	PUI	EDTA	4,1424	4,1507	8,3	7,0E+02
A9	800	PUI	EDTA	4,1778	4,1887	10,9	7,3E+01
B1	2000	PUI	EDTA	4,2562	4,2709	14,7	1,4E+02
D9	2000	PUI	EDTA	4,2298	4,2472	17,4	1,1E+02
E1	200	PUI	EDTA	4,2365	4,2502	13,7	1,5E+01

**Tabla 2.** Datos obtenidos de cada muestra tratada en el grupo del quelante fuerte EDTA.

En la **Figura 50** se observan algunos ejemplos de placas, después de haberse aplicado el tratamiento y hecho las diluciones posteriores. La primera fila corresponde a la dilución 1, la segunda fila a la dilución 2 y la 3 fila a la dilución 3. La primera columna de la imagen corresponde a la muestra control donde no se aplicó tratamiento alguno. Se puede observar cómo en todas las diluciones quedan algunas colonias residuales.



**Figura 50.** Muestras en dilución 1 2 y 3 en raíces aplicadas con el tratamiento de EDTA, comparando con la primera columna que es el control, donde no se aplicó tratamiento alguno. Estas placas de Slanetz-Bartley no tienen sal de tetracizol por lo que las colonias no están teñidas.

### **Resultados del segundo grupo, EDTA y NaOCl al 5,25%**

Los resultados obtenidos de las muestras de trabajo del segundo grupo, tratado con EDTA y NaOCl al 5,25%, tuvieron una media de colonias de  $1,39E+01$ . La tendencia es una reducción de colonias estadísticamente significativa con respecto al grupo control, que fue de  $1,18E+04$ . Si a su vez lo comparamos con el primer grupo tratado solo con EDTA  $1,68E+02$  es menor también. Esto sugiere que ambos irrigantes combinados muestran un efecto mayor que empleando el EDTA de manera individual. Esto se debe a la acción del NaOCl que presenta un gran poder antimicrobiano. La combinación reduce la carga bacteriana, aunque no completamente, debido a la interacción del EDTA con el NaOCl. Si se compara dentro de este segundo grupo los subgrupos de activación para comparar los instrumentos de activación del irrigante XPF tuvo  $1,45E+01$  y PUI un  $1,32E+01$ , son similares y al igual que en el grupo EDTA, el PUI es ligeramente inferior al grupo de XPF (**Tabla 3**).

Medias por grupo	Peso Inicial. mg	Peso Final. mg	Peso Dent.mg	CFU/(ml mg)
Control	4,2377	4,2499	12	1,18E+04
XPF	4,3112	4,3305	19	1,45E+01
PUI	4,2742	4,2839	10	1,32E+01
Grupo total EDTA+ NaOCl	4,2927	4,3072	14	1,39E+01

**Tabla 3.** Medias por el segundo grupo, EDTA y NaOCl. La primera columna correspondería al peso inicial medio de cada muestra, la segunda una vez extraída la dentina y la siguiente sería las medias de dentina obtenida por subgrupo. Por último, el recuento de bacterias medio según la forma de activación y grupo.

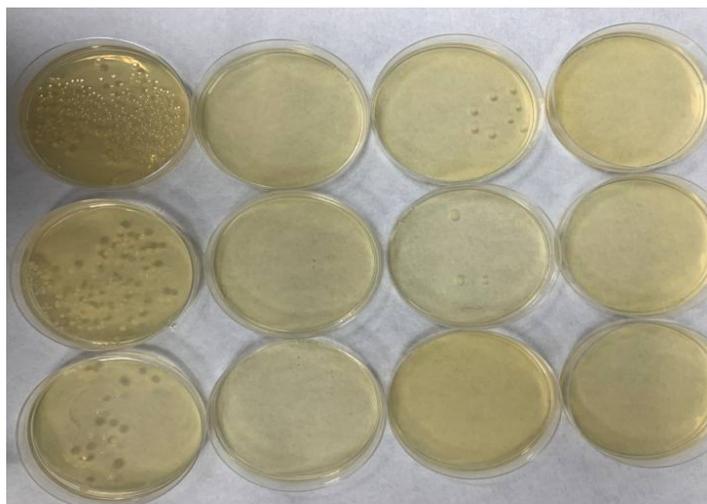
A continuación, se muestran los números individuales de cada muestra pertenecientes al segundo grupo EDTA y NaOCl al 5,25% (**Tabla 4**).

Raíz	CFU	Tratamiento	Irrigante	Peso Inicial.mg	Peso Final.mg	Peso Dent.mg	CFU/(ml mg)
H1	0	XPF	EDTA&Hp	4,2656	4,2699	4,3	1,0E+00
H2	0	XPF	EDTA&Hp	4,2465	4,2610	14,5	1,0E+00
H3	800	XPF	EDTA&Hp	4,2789	4,2875	8,6	9,3E+01
H4	0	XPF	EDTA&Hp	4,2380	4,2507	12,7	1,0E+00
H5	0	XPF	EDTA&Hp	4,2749	4,2817	6,8	1,0E+00
H6	500	XPF	EDTA&Hp	4,2737	4,2902	16,5	3,0E+01
H9	100	XPF	EDTA&Hp	4,3379	4,3478	9,9	1,0E+01
H10	100	XPF	EDTA&Hp	4,3870	4,4028	15,8	6,3E+00
H11	0	XPF	EDTA&Hp	4,4392	4,5292	90	1,0E+00

H12	0	XPF	EDTA&Hp	4,3699	4,3840	14,1	1,0E+00
H7	200000	Pos	EDTA&Hp	4,2387	4,2506	11,9	1,7E+04
H8	120000	Pos	EDTA&Hp	4,2493	4,2620	12,7	9,4E+03
J11	110000	Pos	EDTA&Hp	4,2250	4,2371	12,1	9,1E+03
J1	0	PUI	EDTA&Hp	4,2148	4,2220	7,2	1,0E+00
J2	0	PUI	EDTA&Hp	4,3680	4,3801	12,1	1,0E+00
J3	0	PUI	EDTA&Hp	4,2558	4,2649	9,1	1,0E+00
J4	200	PUI	EDTA&Hp	4,2514	4,2599	8,5	2,4E+01
J5	0	PUI	EDTA&Hp	4,2210	4,2349	13,9	1,0E+00
J6	0	PUI	EDTA&Hp	4,2699	4,2802	10,3	1,0E+00
J7	0	PUI	EDTA&Hp	4,2344	4,2410	6,6	1,0E+00
J8	0	PUI	EDTA&Hp	4,1817	4,1968	15,1	1,0E+00
J9	100	PUI	EDTA&Hp	4,3760	4,3845	8,5	1,2E+01
J10	500	PUI	EDTA&Hp	4,3694	4,3750	5,6	8,9E+01

**Tabla 4.** Datos obtenidos de cada muestra tratada en el grupo del quelante EDTA con NaOCl al 5.25%.

Las placas obtenidas después de las diluciones mostraban una reducción importante y alguna de ellas no presentaba colonias. La primera columna corresponde al grupo control y las tres siguientes a placas tratadas con EDTA y NaOCl al 5,25%, cada fila corresponde al número de dilución (**Figura 51**).



**Figura 51.** Ejemplos de muestras de raíces aplicadas tratamiento de EDTA y NaOCl 5,25% comparado con la primera columna correspondiente al grupo control. Estas placas de Slanetz-Bartley no tienen sal de tretazolio por lo que las colonias no están teñidas.

### Resultados del tercer grupo, HEDP y NaOCl al 5,25%

Los resultados que se obtuvieron en el tercer grupo, HEDP 9% y NaOCl al 5,25%, fueron los más efectivos. Las placas control tuvieron una media de  $1,74E+04$  colonias; en ninguna de las placas de diluciones, después de haberse aplicado el tratamiento hubo crecimiento (**Tabla 5**). Todas las muestras redujeron su nivel bacteriano a cero o por debajo de niveles de detección. De igual forma, ambos subgrupos, los activados con XPF y con PUI, no presentaron ninguna colonia detectable.

Medias por grupo	Peso Inicial. mg	Peso Final. mg	Peso Dent.mg	CFU/(ml mg)
Control	4,2548	4,2756	20,8	$1,74E+04$
XPF	4,2464	4,2545	10,7	1
PUI	4,2630	4,2734	10,2	1
Grupo HEDP	4,2547	4,2639	10,5	1

**Tabla 5.** Medias por el tercer grupo, HEDP. La primera columna correspondería al peso inicial medio de cada muestra, la segunda una vez extraída la dentina y la siguiente sería las medias de dentina obtenida por subgrupo. Por último, el recuento de bacterias medio según la forma de activación y grupo.

A continuación, se presentan los números de cada muestra en los que se aplicó el HEDP y los controles, el término Rinse, hace referencia a DualRinse (DR), la marca comercial del HEDP.

Raíz	CFU	Tratamiento	Irrigante	Peso Inicial.mg	Peso Final.mg	Peso Dent.mg	CFU/(ml mg)
D5	520000	Pos	Ctrl	4,2743	4,2942	19,9	2,60E+04
D6	180000	Pos	Ctrl	4,2403	4,2548	14,5	1,20E+04
D7	150000	Pos	Ctrl	4,2609	4,2822	21,3	7,00E+03
D8	50000	Pos	Ctrl	4,2581	4,2733	15,2	3,30E+03
E8	700000	Pos	Ctrl	4,2358	4,274	38,2	1,80E+04
E9	600000	Pos	Ctrl	4,2596	4,2753	15,7	3,80E+04
D2	0	PUI	Rinse	4,2801	4,293	12,9	1,00E+00
D3	0	PUI	Rinse	4,2460	4,2530	7	1,00E+00
D4	0	PUI	Rinse	4,2789	4,2972	18,3	1,00E+00
D9	0	PUI	Rinse	4,2395	4,2470	7,5	1,00E+00
D10	0	PUI	Rinse	4,2454	4,2520	6,6	1,00E+00
D11	0	PUI	Rinse	4,2428	4,2539	11,1	1,00E+00
D12	0	PUI	Rinse	4,2711	4,2820	10,9	1,00E+00
D13	0	PUI	Rinse	4,2710	4,2822	11,2	1,00E+00
D14	0	PUI	Rinse	4,2685	4,2806	12,1	1,00E+00
D15	0	PUI	Rinse	4,2829	4,2915	8,6	1,00E+00
D16	0	PUI	Rinse	4,2665	4,2750	6,5	1,00E+00
C8	0	XPF	Rinse	4,2483	4,2590	10,7	1,00E+00

C9	0	XPF	Rinse	4,2565	4,2653	8,8	1,00E+00
D1	0	XPF	Rinse	4,2761	4,288	11,9	1,00E+00
C10	0	XPF	Rinse	4,2578	4,2678	10	1,00E+00
C11	0	XPF	Rinse	4,2732	4,2820	8,8	1,00E+00
C12	0	XPF	Rinse	4,1784	4,1772	12	1,00E+00
C13	0	XPF	Rinse	4,2717	4,2735	18	1,00E+00
C14	0	XPF	Rinse	4,2330	4,2400	7	1,00E+00
C15	0	XPF	Rinse	4,2518	4,2615	9,7	1,00E+00
C16	0	XPF	Rinse	4,2731	4,2870	13,9	1,00E+00
C17	0	XPF	Rinse	4,1906	4,1980	7,4	1,00E+00

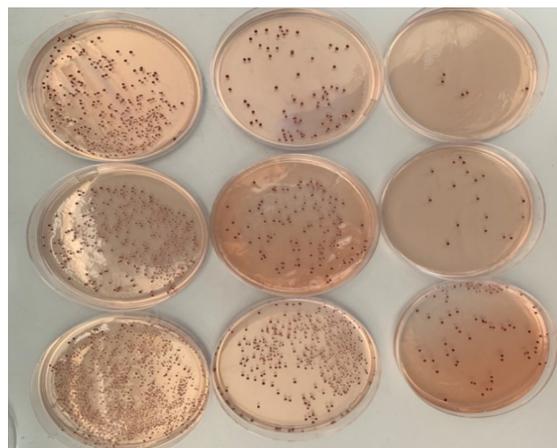
**Tabla 6.** Datos obtenidos de cada muestra tratada en el grupo del quelante HEDP con NaOCl 5,25%.

A continuación, se observa imágenes de algunas muestras en las que se aplicó tratamiento con HEDP, comparándola con placas control (**Figura 52**).

**A)**



**B)**



**Figura 52.** Muestras aplicado tratamiento con HEDP y NaOCl al 5,25% (**A**) comparadas con muestras de raíces control (**B**). Estas placas de Slanetz-Bartley sí tienen sal de tretazolio por lo que las colonias sí están teñidas.

## Resultados del cuarto grupo PBS

Los resultados obtenidos en el cuarto grupo, el cual se irrigó con PBS, mostraron unos resultados muy similares a los del grupo control. Mientras que la media del control fue de  $5,60E+03$  la media del grupo tratado con PBS activado fue de  $6,58E+03$ . Aunque hay un ligero incremento en los grupos tratados esto se debe a que en las muestras de dentina se extrajo más cantidad que respecto al control, lo que explica esta ligera variación. Si se compara los dos subgrupos, la media de XPF fue de  $8,33E+03$  colonias frente a  $4,82E+03$  de las muestras activadas con PUI (**Tabla 7**). Estos resultados siguen la tendencia de los grupos anteriores de presentar una ligera disminución en los subgrupos activados con XPF respecto a los activados con PUI.

Medias por grupo	Peso Inic.	Peso Fin.	Peso Dent.	CFU/(ml mg)
Control	4,2636	4,2788	15	$5,60E+03$
PUI	4,2523	4,2679	15,5	$4,82E+03$
XPF	4,2708	4,2871	16	$8,33E+03$
Grupo PBS	4,2615	4,2775	16	$6,58E+03$

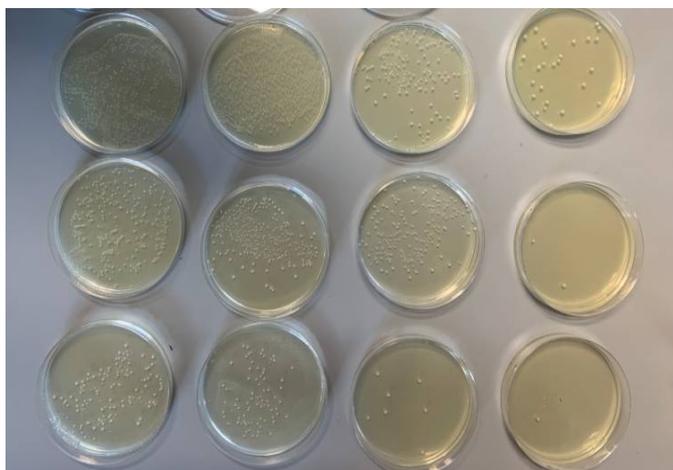
**Tabla 7.** Medias por el cuarto grupo, PBS. La primera columna correspondería al peso inicial medio de cada muestra, la segunda una vez extraída la dentina y la siguiente sería las medias de dentina obtenida por subgrupo. Por último, el recuento de bacterias medio según la forma de activación y grupo.

A continuación, se verán los resultados obtenidos de cada muestra individual control y tratada con PBS activado (**Tabla 8**).

Raíz	CFU	Tratamiento	Irrigante	Peso Inic.	Peso Fin.	Peso Dent.	CFU/(ml mg)
E6	20000	XPF	PBS	4,2769	4,2881	11,2	1,80E+03
E7	80000	PUI	PBS	4,2585	4,2748	16,3	4,90E+03
E2	300000	PUI	PBS	4,2499	4,2742	24,3	1,20E+04
E3	600000	XPF	PBS	4,2757	4,2918	16,1	3,70E+04
F1	30000	PUI	PBS	4,2644	4,277	12,6	2,40E+03
F2	10000	PUI	PBS	4,2345	4,2503	15,8	6,30E+02
F3	60000	PUI	PBS	4,2573	4,269	11,7	5,10E+03
F4	50000	PUI	PBS	4,2492	4,262	12,8	3,90E+03
F5	20000	XPF	PBS	4,2516	4,2662	14,6	1,40E+03
F6	50000	XPF	PBS	4,2589	4,2877	28,8	1,70E+03
F7	70000	XPF	PBS	4,2784	4,2897	11,3	6,20E+03
F8	30000	XPF	PBS	4,2832	4,299	15,8	1,90E+03
F9	80000	Pos	Ctrl	4,2502	4,2647	14,5	5,50E+03
G1	90000	Pos	Ctrl	4,2721	4,2838	11,7	7,70E+03
G2	70000	Pos	Ctrl	4,2684	4,2879	19,5	3,60E+03

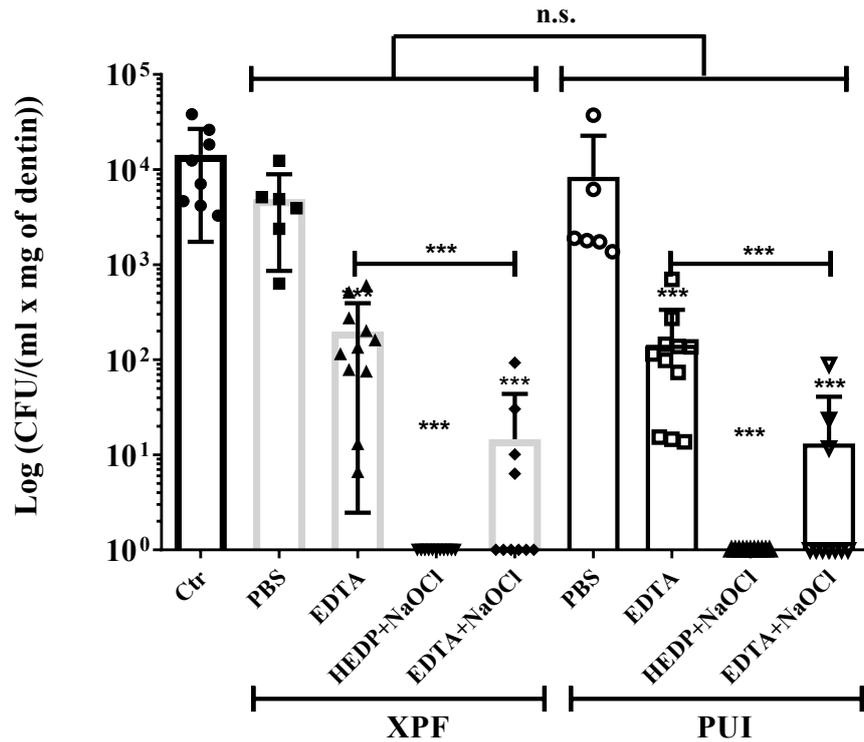
**Tabla 8.** Datos obtenidos de cada muestra tratada en el grupo del PBS.

Se observa en las siguientes imágenes de muestras tratadas con PBS la presencia de colonias después del tratamiento siendo muy similares a las del grupo control (**Figura 53**).



**Figura 53.** Raíces del Grupo cuarto irrigado con PBS y activado con PUI y XPF y comparado con control, primera columna. Las filas corresponden al número de dilución, fila 1 dilución 1, fila 2 dilución 2 y fila 3 dilución 3. Estas placas de Slanetz-Bartley no tienen sal de tretazolio por lo que las colonias no están teñidas.

Después de analizar los diferentes grupos se puede afirmar los siguientes resultados. En el primer grupo, el quelante fuerte EDTA, tiene acción bactericida ya que reduce la carga bacteriana después del tratamiento y disminuye significativamente respecto al grupo control positivo, tanto para la activación con PUI como XPF. En el segundo grupo, la combinación de EDTA y NaOCl al 5,25% disminuye significativamente los niveles bacterianos, pero siguen siendo detectables en placa y, al igual que en el primer grupo, no hay diferencias significativas entre activar este irrigante con PUI o con XPF. En el tercer grupo, el quelante débil HEDP, tenemos una eliminación de la carga bacteriana completa, dejándola por debajo del umbral de detección en placa para ambos sistemas de activación (PUI y XPF). En el grupo cuarto irrigado con PBS se observa que no presenta acción bacteriana alguna ya que no hay reducción de colonias con respecto al control, presentando una ligera disminución debido a la propia activación del irrigante con PUI o XPF por el simple hecho del arrastre mecánico (**Figura 54**).



**Figura 54.** Barras de los diferentes grupos con el número de colonias comparándolo con el control. Las barras grises serían los grupos activados con XPF y las barras negras con PUI. En todas ellas vemos colonias a excepción del grupo irrigado con HEDP DualRinse independientemente si se activa con PUI o XPF.

Si se compara la forma de activación, de estos irrigantes no tiene diferencias significativas ni comparándolo entre grupos, ni dentro de cada grupo, aunque existe una tendencia de mayor reducción bacteriana en los grupos activados con PUI respecto a los grupos activados con XPF. También se puede observar que el irrigante neutro PBS presenta una reducción de carga bacteriana respecto al control, probablemente por la propia activación y el arrastre mecánico que produce.

Si se compara el número de colonias dentro de cada grupo, con una media de las muestras control podemos ver que el HEDP y el EDTA con NaOCl 5,25% muestran los números más bajos. Esto parece indicar que la combinación de un quelante con el NaOCl 5,25% es efectiva frente al *E.faecalis*. Dentro de estos dos quelantes el HEDP combina mejor que el EDTA. La activación de PUI y XPF parece igual de efectiva, siendo ligeramente más baja la activación mediante PUI (**Tabla 9**).

	Total	XPF	PUI
Control	9,82E+03	1,45E+01	1,32E+01
EDTA	1,68E+02	1,96E+02	1,43E+02
EDTA y NaOCl	1,39E+01	1,45E+01	1,32E+01
HEDP	1	1	1
PBS	6,58E+03	8,33E+03	4,82E+03

**Tabla 9.** Comparación de número de colonias después de haber aplicado tratamiento en los diferentes grupos.

# **DISCUSIÓN**

El estudio realizado se basa en analizar la capacidad antimicrobiana que tienen los quelantes combinados con el hipoclorito de sodio, al activarlos, para eliminar las colonias de biofilm maduro de *Enterococcus faecalis*. La discusión se centrará primero en el material y método y en segundo lugar a los resultados obtenidos tras la realización del estudio.

## **Discusión del material y método**

Para el estudio se emplearon dientes superiores e inferiores tanto uniradiculares como multiradiculares. El criterio de elección fue dientes que presentaran un único conducto radicular, comprobándose con exploración directa y dos radiografías periapicales una en sentido mesio-distal y otra vestibulo-lingual/palatino; a diferencia de otros estudios, que emplearon dientes únicamente uniradiculares o dientes con variaciones anatómicas intraconducto como algunos premolares inferiores (135-137). Los dientes del estudio se decoronaron, para obtener únicamente la raíz y así poder tener una longitud normalizada, en nuestro caso de 17mm, longitud estandarizada por otros estudios anteriores (138-140).

La biomecánica previa de los conductos radiculares se realizó con lima Wave One Gold primary, debido a la buena limpieza y a su aleación de níquel titanio que le permite conformar el conducto radicular sin alterar en exceso su forma original. También es un sistema rotatorio que presenta menos casos de fisuras radiculares y cracks, así como transportes y deformaciones del tercio apical (141-143).

La permeabilidad del conducto radicular o patency se mantuvo siempre con una lima K-flexo-file de calibre 010, con el fin de remover el detritus que se genera y evitar obstrucciones o tapones. Es importante realizar esto ya que se ha visto que incrementa la penetración de la solución irrigante y aumenta significativamente el flujo de irrigante hacia el ápice (144).

## Discusión sobre la elección de los irrigantes

### Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)

Antes de hablar del EDTA, no podemos dejar de señalar que, en mucha de la literatura publicada sobre este, hay lo a nuestro juicio es un error común. Se emplea indistintamente el término del quelante EDTA cuando lo que realmente importante es saber qué tipo de sal de este quelante se emplea. Hay diferencias en el comportamiento del medio dependiendo del tipo de sal que se utilice, sal disódica o tetrasódica de EDTA (68, 77). De ahí la importancia de especificar este aspecto en la metodología de los estudios. La mayoría de los estudios no especifican que tipo de sal emplean describiendo únicamente la concentración, que suele ser del 17%.

En esta tesis doctoral se ha usado la sal disódica del quelante EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) al 17% puesto que se trata de un quelante fuerte y suele ser el más utilizado en clínica. Se ha visto que puede interaccionar con el  $\text{NaOCl}$  al mezclarlo de manera inmediata, pero que (66, 72, 145, 146) no se ha estudiado lo que ocurre cuando es dispensado pasado un tiempo de trabajo, en nuestro estudio de 1 hora.

Hay discusión sobre si el EDTA tiene poder bactericida. Hay artículos que defienden que sí presenta actividad antimicrobiana tanto para *Streptococos* y *Stafilococos Aureus* (49) como para *Enterococcus faecalis* (66, 147). Zehnder y cols (68) mostraron que una solución de EDTA al 17% inhibía el crecimiento bacteriano del *Enterococcus faecalis* a una disolución de 1/1 y 1/10 pero no 1/100, concluyendo que presentaba más capacidad antibacteriana inhibitoria que propiamente bactericida.

Sin embargo, otros estudios defienden que el EDTA no tiene actividad antimicrobiana. Arias Moliz (148) Torabinejad y cols (149) o Mello y cols (150) demostraron que la solución de EDTA al 17% no posee capacidad antibacteriana incluso estando en contacto con el EDTA por 60 minutos (148).

Goldman y cols (151) determinaron en su estudio que la solución de EDTA independientemente de la concentración, reduce significativamente las bacterias

en conductos necróticos al compararlo con solución salina. Esto puede ser debido al efecto que tiene el EDTA sobre el barrillo dentinario, obteniendo una reducción bacteriana por arrastre mecánico (151). Gracias a la capacidad quelante del EDTA sobre la dentina, puede desprender biofilm adherido a las paredes del conducto radicular (9). El EDTA, por tanto, ayuda a regularizar químicamente la dentina, disolver el barrillo dentinario y aumentar la permeabilidad dentinaria y gracias a esto puede tener actividad antimicrobiana, tanto solo como acompañado de NaOCl.

### **Ácido etidróico**

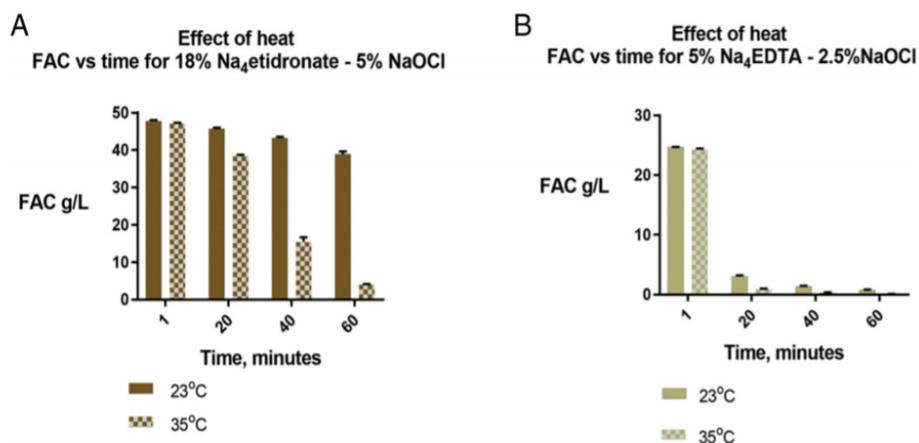
Al igual que ocurre con el EDTA, el HEDP se emplea en la literatura el término de ácido etidróico y etidronato por igual, cuando lo que realmente se utiliza es la sal tetrasódica del ácido etidróico ( $\text{Na}_4\text{HEDP}$ ). Este quelante se propuso como alternativa al EDTA por ser más compatible con el NaOCl (68, 69).

La elección del ácido etidróico hace que nos podamos plantear este irrigante como una buena alternativa en el proceso de quelación continua, en la que se usa de manera simultánea el hipoclorito de sodio NaOCl y un quelante durante la preparación químico-mecánica (68).

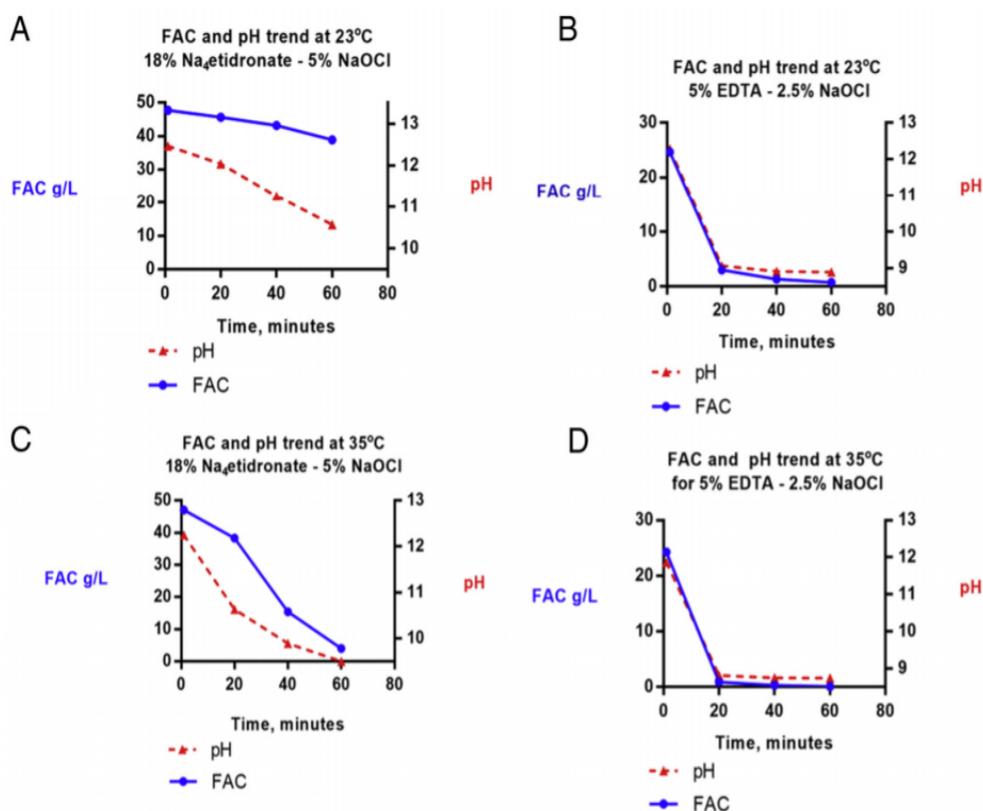
La diferencia principal del  $\text{Na}_4\text{HEDP}$  respecto a  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  es que, es un quelante débil alcalino que actúa en rango de pH de 10,8-12,2, mientras que la sal disódica de EDTA trabaja a un pH neutro en torno a 7 (69).

Estas condiciones alcalinas del HEDP favorecen su uso con el NaOCl (77, 145). La ventaja es que permite aumentar la concentración máxima del hipoclorito anión, que es el principal causante en la disolución de tejidos orgánicos (69, 78, 145).

Wright y cols (152) compararon el efecto del HEDP con la sal tetrasódica del EDTA ( $\text{Na}_4\text{EDTA}$ ) la cuál actúa también a un pH básico (10-11), y los resultados que obtuvieron para mantener el pH y la concentración de cloro libre disponible (FAC) fueron, que el HEDP se comportaba mejor durante un periodo largo de tiempo (**Figura 55-56**).



**Figura 55.** Tabla comparativa del HEDP y Na<sub>4</sub>EDTA sobre cantidad de cloro libre (FAC), según el calor durante 60 minutos. La imagen (A) muestra la gran disponibilidad de cloro libre a temperatura ambiente con una concentración de NaOCl al 5,25% y HEDP. Sin embargo, a más temperatura esta disponibilidad se reduce con el paso del tiempo. En la imagen (B) a una concentración menor de NaOCl junto con Na<sub>4</sub>EDTA presenta una disponibilidad mucho menor y desciende de manera más acusada con el paso del tiempo (152).



**Figura 56.** Figuras comparativas de HEDP (A) y (C) varias soluciones de EDTA (B) y (D) y como afecta la temperatura y el tiempo en la disponibilidad del cloro libre disponible (FAC) y en el pH del medio (152).

También compararon a temperatura ambiente (23°C) en un tiempo prolongado, quién mantenía mayor cantidad de cloro libre disponible (FAC) y el pH del medio estable, siendo el HEDP quien mantuvo las mejores condiciones.

El tiempo de trabajo establecido para nuestro estudio fue de 1 minuto, basándonos en estudios previos de Wright y cols (152) y Biel y cols (77) (**Figura 57**). Estos defienden que un tiempo prolongado puede disminuir la eficacia del quelante, y que la combinación de ambos irrigantes, quelante e hipoclorito de sodio, es mejor cuando el tiempo es menor.

Salt (wt/wt)	1 min	10 min	20 min	30 min	60 min
18% Na <sub>4</sub> HEDP					
Available chlorine (%)	95 ± 2	92 ± 2	88 ± 2	83 ± 2	72 ± 3
pH range	11.6	11.5-11.7	11.4-11.6	11.3-11.5	11.1-11.2
Temperature (°C)	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
9% Na <sub>4</sub> HEDP					
Available chlorine (%)	99 ± 1	97 ± 0	95 ± 0	93 ± 1	87 ± 3
pH range	11.0-11.2	11.1-11.2	11.1	11.0-11.1	10.9-11.0
Temperature (°C)	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0
18% Na <sub>4</sub> EDTA					
Available chlorine (%)	73 ± 1	10 ± 1	8 ± 0	7 ± 1	6 ± 2
pH range	11.2-11.5	9.8	9.7-9.8	9.7-9.8	9.7
Temperature (°C)	21 ± 1	25 ± 0	23 ± 0	22 ± 0	21 ± 1
3% Na <sub>4</sub> EDTA					
Available chlorine (%)	95 ± 1	93 ± 1	90 ± 1	87 ± 1	17 ± 0
pH range	12.1-12.6	12.1-12.2	11.5-12.0	11.5-11.9	9.7-9.8
Temperature (°C)	20 ± 1	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	23 ± 1
None (control)					
Available chlorine (%)	100 ± 1	99 ± 0	100 ± 1	100 ± 2	99 ± 1
pH range	11.7	11.6-11.8	11.7	11.7-11.8	11.6-11.8
Temperature (°C)	22 ± 1	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0

**Figura 57.** Tabla con diferentes soluciones de EDTA y HEDP, para mostrarnos la cantidad de cloro disponible según el pH y tiempo (77).

## Discusión sobre las técnicas de activación de la irrigación

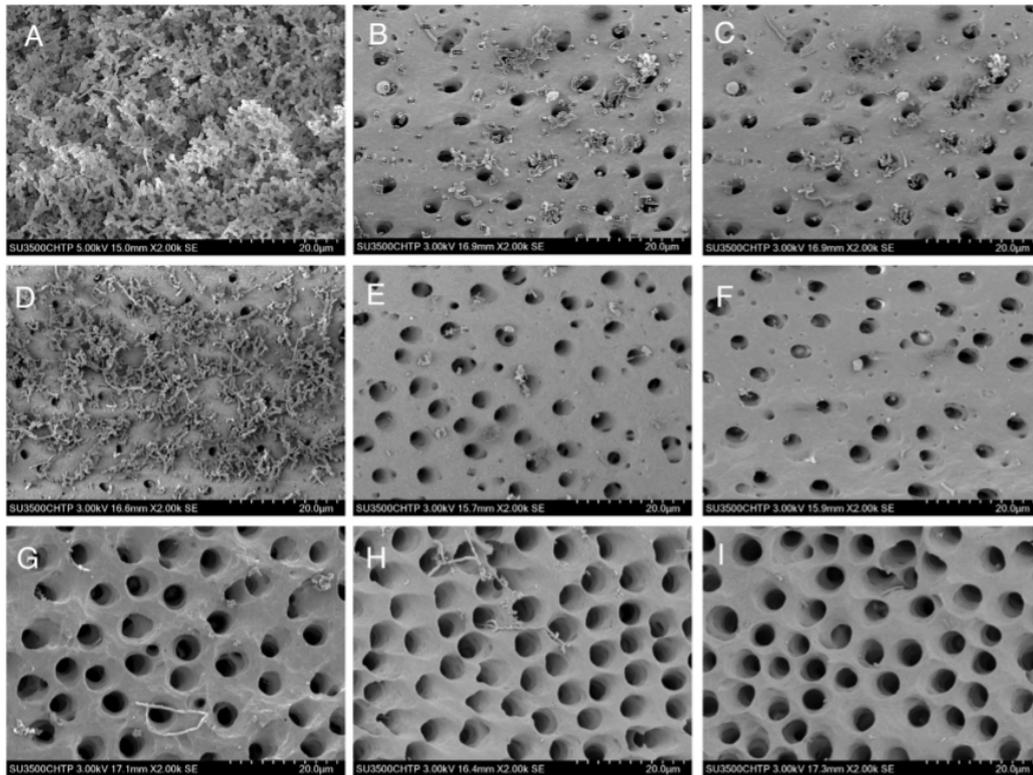
Las técnicas de activación que se han escogido en nuestro estudio han sido la activación ultrasónica pasiva (PUI) y la Endo XP finisher (XPF). Existe gran cantidad de literatura sobre la activación ultrasónica pasiva que demuestra la efectividad en la acción antibacteriana del irrigante, pero no hay un protocolo exacto establecido sobre qué tipo de irrigante emplear, qué volumen del mismo o cuales deben ser los tiempos de activación (86, 101, 153-157).

La principal característica del sistema de activación PUI, es que no contacta el instrumento de activación con las paredes del conducto lo que minimiza el riesgo de deformaciones o cavitaciones que alteren la superficie original (158). La activación se realiza después de la preparación biomecánica completa (9). La energía es transmitida en nuestro caso con la lima irrisafe 20/21 a una frecuencia de unos 30 kHz y con una intensidad 1 en nuestro aparato ultrasónico ya que una intensidad mayor puede provocar la fractura del instrumento (86, 154).

En la irrigación ultrasónica pasiva como vimos antes, podemos aplicar el flujo del irrigante de manera continua o intermitente, pero vemos que la renovación del irrigante durante la activación de manera intermitente favorece más la limpieza de los conductos. En nuestro estudio elegimos ciclos de 20 segundos para renovar el irrigante tres veces durante 1 minuto (159, 160).

La otra técnica de irrigación, la XPF, se basa en un instrumento para la agitación de los irrigantes a una menor velocidad, pero que al igual que el PUI mejorar la eficacia de la irrigación (86, 154, 155). Hay poca literatura que estudie la eficacia de esta activación comparándola con PUI, pero los artículos expuestos son optimistas con su eficacia en la desinfección y como una buena alternativa (85, 160).

Bao y cols (160) compararon en dos estudios estas formas de activación PUI y XPF, siendo ambas efectivas cuando el irrigante se activaba en varios ciclos (flujo intermitente) (**Figura 58-59**).



**Figura 58.** (A) y (B) antes de aplicar tratamiento, (B) y (C) los resultados tras activación PUI, (E) y (F) activación XPF y (G-I) activados en varios ciclos el irrigante con PUI y XPF (160).

Group*	Inside groove				Outside groove			
	Apical	Middle	Coronal	Total <sup>a</sup>	Apical	Middle	Coronal	Total <sup>b</sup>
CNI 1	25.79 ± 9.22	25.88 ± 7.79	29.33 ± 10.53	27.00 ± 9.33 <sup>c</sup>	1.29 ± 1.15	1.69 ± 1.37	1.75 ± 1.61	1.58 ± 1.39 <sup>g</sup>
CNI 2	26.46 ± 9.23	25.30 ± 7.48	28.68 ± 8.84	26.81 ± 8.61 <sup>c</sup>	1.34 ± 0.95	1.51 ± 0.84	1.75 ± 1.36	1.53 ± 1.08 <sup>g</sup>
PUI 1	6.17 ± 3.67	5.92 ± 2.45	5.90 ± 2.52	6.00 ± 2.91 <sup>d</sup>	1.27 ± 1.02	1.20 ± 0.93	1.01 ± 0.56	1.16 ± 0.86 <sup>f</sup>
PUI 2	5.65 ± 2.96	5.94 ± 2.47	5.57 ± 2.52	5.72 ± 2.65 <sup>d</sup>	1.14 ± 0.93	1.28 ± 1.06	0.98 ± 0.36	1.13 ± 0.84 <sup>f</sup>
XPF 1	2.95 ± 2.35	2.71 ± 1.98	3.16 ± 2.16	2.94 ± 2.16 <sup>e</sup>	0.77 ± 0.44	0.83 ± 0.46	0.85 ± 0.48	0.82 ± 0.46 <sup>h</sup>
XPF 2	0.90 ± 0.47	1.12 ± 0.62	1.09 ± 0.63	1.04 ± 0.59 <sup>f</sup>	0.74 ± 0.42	0.79 ± 0.40	0.86 ± 0.45	0.80 ± 0.42 <sup>h</sup>

**Figura 59.** Comparación de diferentes tercios del diente, coronal, medio y apical irrigados con activación manual (CNI), PUI y XPF con flujo continuo (1) o en varios ciclos de activación (2). Observamos que la reducción es mayor en PUI y XPF y en ciclos de activación superior a un flujo continuo (160).

## Discusión sobre el biofilm de *Enterococcus faecalis*

Se seleccionó una cepa de *Enterococcus faecalis* debido a su asociación recurrente con lesiones perirradiculares. Dentro de estas lesiones se engloban las lesiones endodónticas primarias y las infecciones persistentes (131).

Las infecciones endodónticas primarias, se asocian principalmente con lesiones perirradiculares crónicas asintomáticas, más que con lesiones agudas o absesos endoperiodontales. La prevalencia que tiene el *E.faecalis* en estas infecciones llega a ser de hasta el 40% (131). Sin embargo, en lesiones persistentes, la frecuencia del *E.faecalis* es mucho más alta. En casos de retratamiento endodóntico es incluso nueve veces más probable que exista *E.faecalis* comparado con las infecciones endodónticas primarias (131). Estudios que han investigado la prevalencia de *E.faecalis* en infecciones persistentes de dientes con tratamientos endodónticos previos, puede llegar hasta un 77% (131, 161-165) (**Figura 60**).

Author/year	Number of Root-filled Teeth in Study	Number of Root-filled Teeth with Bacterial Growth	Prevalence of <i>E. faecalis</i>	Method of Detection
Engström 1964 (24)	54	21	5/21 = <b>24%</b>	Culture
Möller 1966 (25)	264	120	34/120 = 28%	Culture
Molander et al. 1998 (3)	100	68	32/68 = 47%	Culture
Sundqvist et al. 1998 (4)	54	24	9/24 = 38%	Culture
Peciuliene et al. 2000 (26)	25	20	14/20 = 70%	Culture
Peciuliene et al. 2001 (27)	40	33	21/33 = 64%	Culture
Hancock et al. 2001 (5)	54	33	10/33 = 33%	Culture
Pinheiro et al. 2001 (28)	60	51	27/51 = 53%	Culture
Pinheiro et al. 2003 (29)	30	24	11/24 = 46%	Culture
Siqueira & Rôças 2004 (30)	22	22	17/22 = <b>77%</b>	PCR
Gomes et al. 2004 (31)	19	19	6/19 = 32%	Culture
Rôças et al. 2004 (7)	30	30	20/30 = 67%	PCR

**Figura 60.** Comparación de diferentes estudios sobre la prevalencia de *E. faecalis* en dientes ya endodonciados con infecciones persistentes mostrando el método de identificación bacteriana, como se puede observar el método de cultivo es el más frecuente (165).

Estas diferencias en la prevalencia de *E.faecalis* puede deberse a las diferentes técnicas de identificación bacteriana, a diferencias geográficas o al tamaño de la muestra (166, 167). En algunos casos, *E.faecalis* se ha encontrado como el único organismo presente en dientes ya tratados con lesiones perirradiculares (168, 169). La mayoría de estos estudios se han realizado utilizando técnicas de cultivo;

sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**) es actualmente el método para la detección de *E.faecalis* más rápido y más preciso (170, 171).

El *E.faecalis* posee factores de virulencia como las enzimas líticas, la citolisina o sustancias de agregación le permiten alterar la respuesta del huésped y provocar un fracaso endodóntico. También es capaz de compartir estos rasgos de virulencia entre las especies, contribuyendo aún más a su supervivencia y la capacidad de causar enfermedades (172). El *E.faecalis* es menos dependiente de los factores de virulencia que otras bacterias. Depende más sobre su capacidad de sobrevivir y persistir que como un patógeno directo en los conductos radiculares (131). En otras palabras, aunque el *E.faecalis* posee la capacidad de alterar la respuesta del huésped y provocar reinfecciones, se caracteriza más por resistir y ser una bacteria difícil de eliminar, lo que ayuda en el conjunto del biofilm a proteger a otras bacterias a que se desarrollen y puedan ser más dañinas.

Otra característica del *E.faecalis* es su tamaño pequeño, lo que le permite invadir y sobrevivir en el interior de los túbulos dentinarios (173). Además, gracias a su resistencia, puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo sin un suministro nutricional adecuado dentro de estos túbulos (174). Se ha demostrado que el *E.faecalis* en los túbulos dentinarios puede sobrevivir ante el contacto de un antimicrobiano como puede ser el  $\text{Ca(OH)}_2$  durante 10 días (38, 175). Esto es debido a la capacidad de formar biofilm por sí mismo, permitiendo que la bacteria se vuelva 1000 veces más resistente a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos (132). Por esta razón, es importante el uso de quelantes para eliminar el barrillo dentinario que obstruye la entrada a los túbulos y permitir que queden expuestos para que el  $\text{NaOCl}$  pueda acceder a ellos y desinfectarlos (63, 149, 176).

## **Discusión de los resultados**

### **Discusión sobre la eficacia del EDTA**

Los resultados obtenidos en el grupo de irrigación EDTA muestran una disminución significativa de bacterias con respecto al grupo control. Sin embargo, la presencia de colonias presentes en las placas posteriores al tratamiento en

diferentes diluciones nos hace pensar que el efecto antimicrobiano del EDTA por sí mismo no es suficiente para reducir las colonias a un nivel satisfactorio.

Las colonias conforman las biopelículas de biofilm, estas biopelículas básicamente son comunidades de bacterias adheridas a las superficies, protegidas por la sustancia polimérica extracelular (EPS) (120). La EPS consiste esencialmente en agua, proteínas, polisacáridos y ADN extracelular (120). También contienen Metales como el calcio (Ca), que juega un papel importante, manteniendo la estabilidad, la arquitectura, la viscosidad y la fuerza del biofilm (120, 177). El EDTA, actúa directamente sobre este calcio lo que produce la dispersión de la biopelícula (178, 179), pudiendo explicar esta reducción de colonias con respecto a los grupos control. Por lo que una opción viable podría ser, el uso de EDTA con otros compuestos para mejorar su actividad antibacteriana.

Ferrer-Luque y cols (180) vieron que la actividad antibacteriana del EDTA por sí solo no era suficiente (41, 181). Realizaron estudios in vitro para evaluar la eficacia del EDTA contra el *E.faecalis*, combinándolo en algunos grupos con Cetrimida (CTR). La cetrimida está formada principalmente por bromuro de tetradeciltrimetilamonio. Posee una alta actividad bactericida sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Además, la cetrimida presenta actividad sobre ciertos virus y hongos. Su acción es mayor a pH neutro o ligeramente alcalino, pero es menor a pH ácido y en presencia de materia orgánica. Se utiliza en forma de solución o de crema para la desinfección de la piel ante quemaduras y heridas. En odontología se suele combinar con la clorhexidina (148, 180).

La aplicación del tratamiento sería posterior a la instrumentación biomecánica y se evaluaría a los 60 días (148, 180). Los resultados que obtuvieron demostraron que los grupos con EDTA que contenían cetrimida tenían un mayor efecto que los quelantes por sí mismos, llegando incluso al 100% de desinfección (**Figura 61**).

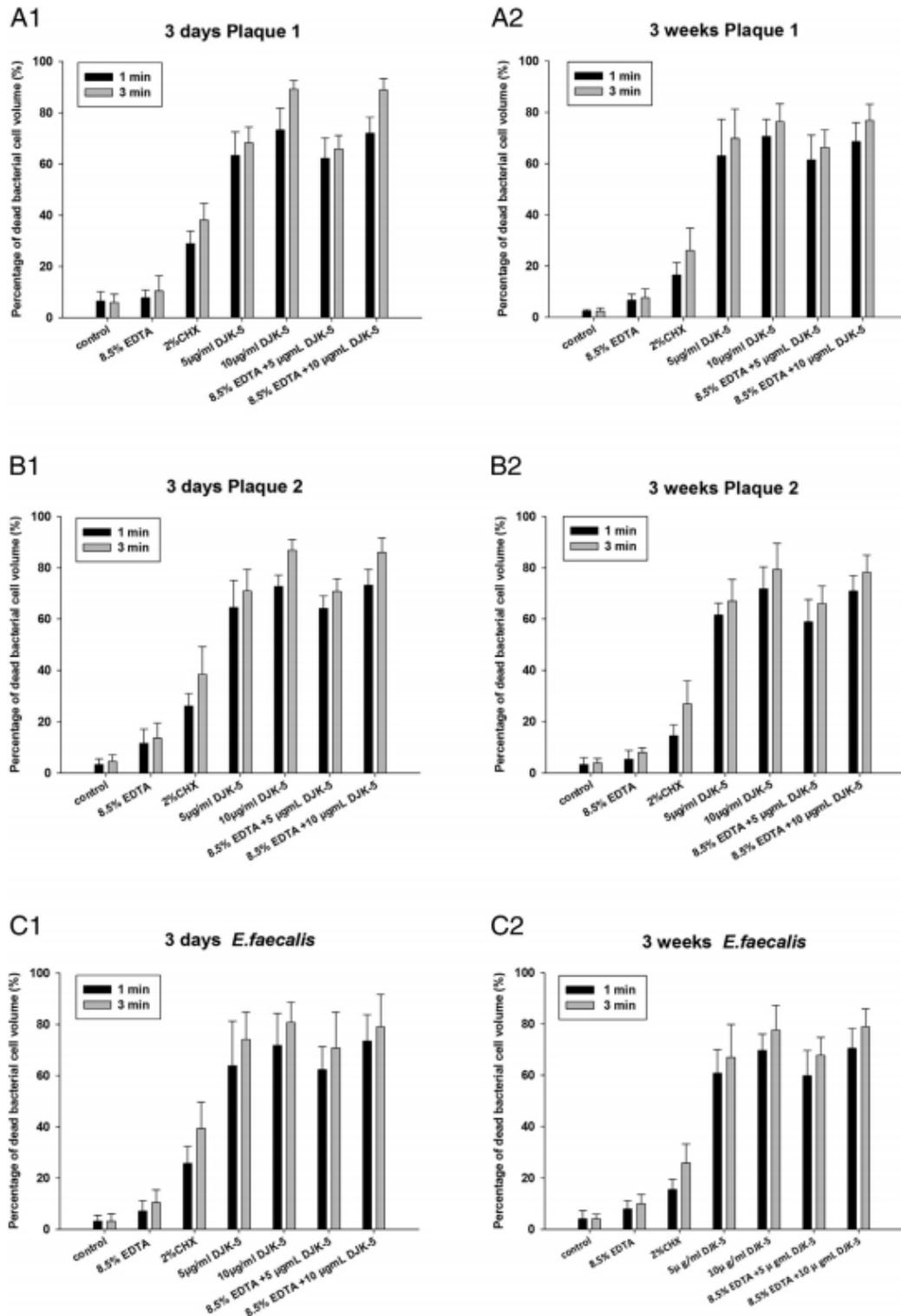
	Evaluated time (days)*						
	5	10	15	20	25	30	60
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Group I	12 (80.0)	9 (60.0)	6 (40.0)	4 (26.6)	3 (20.0)	3 (20.0)	3 (20.0)
Group II	15 (100.0)	11 (73.3)	11 (73.3)	10 (66.6)	10 (66.6)	10 (66.6)	10 (66.6)
Comparison P value <sup>†</sup>	.112	.350	.070	.033	.013	.013	.013
Group III	15 (100.0)	9 (60.0)	8 (53.3)	7 (46.6)	6 (40.0)	5 (33.3)	4 (26.6)
Group IV	15 (100.0)	11 (73.3)	11 (73.3)	10 (66.6)	10 (66.6)	10 (66.6)	10 (66.6)
Comparison P value <sup>†</sup>	1.000	.350	.225	.231	.136	.072	.033
Group V	13 (87.0)	9 (60.0)	3 (20.0)	3 (20.0)	3 (20.0)	3 (20.0)	3 (20.0)
Group VI	14 (93.3)	10 (66.6)	10 (66.6)	9 (60.0)	9 (60.0)	9 (60.0)	9 (60.0)
Comparison P value <sup>†</sup>	.500	.500	.013	.030	.030	.030	.030

**Figura 61.** Los grupos II, IV y VI son los tratamientos tratados añadido CTR a los grupos de irrigación. Nos interesa en esta tabla ver el Grupo I, EDTA aplicado solo y Grupo II donde se aplica EDTA con CTR y podemos ver la mejora en la desinfección bacteriana (180).

Wang y cols en 2017, (182) compararon la actividad antimicrobiana del EDTA combinándolo con un péptido para examinar su actividad antibacteriana contra las biopelículas formadas por *E.faecalis*. En su estudio, emplearon un péptido sintético catiónico llamado DJK-5, que se ha demostrado con buena actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en biofilms maduros (120, 177).

Los péptidos antimicrobianos, son conocidos también como péptidos de defensa del huésped. Estos pueden ser naturales o sintéticos y tienen actividad antimicrobiana contra muchos tipos de bacterias en estado planctónico y/o en biopelículas (120, 177, 183). También actúan en el proceso de la respuesta innata y en la modulación inmune adaptativa a través del reclutamiento y activación de células inmunes, regulación de la autofagia celular y apoptosis, lo que lleva a un aumento de la destrucción de bacterias y reducción de la inflamación (120). La acción principal del DJK-5 es interferir en la adaptación de las bacterias, mediante la degradación del ppGpp, un nucleótido importante en el desarrollo de las biopelículas bacterianas (120, 177, 183).

El estudio demostró una alta actividad contra biofilm por el Péptido DJK-5 solo y combinado con el EDTA después de 1 y 3 minutos de exposición (177). Sin embargo, debido a que El DJK-5 es catiónico, podría interferir al mezclarlo con un quelante ya que capta los iones con carga positiva como el (Ca) de la dentina, y por tanto interferir con la actividad antimicrobiana del péptido. Aun con esto, obtuvieron en ambos casos resultados similares (**Figura 62**).



**Figura 62.** Los resultados de este estudio indicaron que el péptido DJK-5 puede ser una alternativa para infecciones empleado en combinación con EDTA. Las tablas muestran diferentes tiempos en contacto con el *E.faecalis* teniendo el DJK-5 resultados muy similares pese las variaciones de tiempo. A su vez, muestra las barras que corresponden con el mayor volumen de bacterias eliminadas (182).

En la literatura por tanto la actividad antibacteriana del EDTA parece ser por sí mismo débil o según otros estudios, directamente no tenerla (184-187). Algunos incluso sugieren puede tener cierta actividad antimicótica (188, 189), pero lo que tenemos claro es, que no es suficiente por sí mismo para ejercer como agente antimicrobiano.

Es por esto por lo que se buscan coadyuvantes para mejorar esta actividad antimicrobiana y completar con el resto de las propiedades que ya tiene el EDTA. En conclusión, el EDTA gracias a sus propiedades como quelante provoca la dispersión de biopelículas, principalmente por arrastre mecánico, lo que explica la reducción de colonias, pero no es un antimicrobiano.

### **Discusión sobre el EDTA e hipoclorito de sodio al 5,25%**

De nuestros resultados obtenidos deducimos que la combinación EDTA 17% y NaOCl 5,25 % como irrigante en protocolo final, disminuye el número de colonias de *E.faecalis*, independientemente de si se activa con XPF o PUI. Pese al incremento en la disminución de colonias, sigue habiendo presencia de bacterias en las diluciones posteriores.

Esto nos hace pensar que al emplear los dos irrigantes se consigue un incremento en la limpieza y desinfección respecto a la irrigación únicamente con EDTA, ya que conseguimos asociar las ventajas de los dos, la capacidad antibacteriana y la disolución de los tejidos orgánicos del NaOCl y la capacidad de remoción de tejido inorgánico y la eliminación del barrillo dentinario de EDTA.

Además de lo explicado hasta ahora, estudios previos defienden que el mejor protocolo de irrigación final es la combinación de hipoclorito sodio 5,25% y EDTA. Esto se debe a la acción del quelante que permite una mayor difusión del hipoclorito por el interior del conducto(30, 190). Yamada y cols (30) y Niu y cols (190) defienden esta combinación incluso hablan de que una concentración menor de hipoclorito sodio 2,5% es efectiva junto al EDTA para la eliminación de biofilm maduro de *E.faecalis* (68, 191, 192).

Sin embargo, la presencia de colonias presentes en las placas hace que, aún disminuyendo considerablemente el número de bacterias nos planteemos una

interacción negativa entre estos dos irrigantes que evita por completo la desinfección o deje los niveles bacterianos por de debajo de detección.

Esto se debe principalmente al efecto que tiene el EDTA sobre el cloro libre que influye en la acción de desinfección del NaOCl. La actividad antimicrobiana del NaOCl depende directamente de la disponibilidad del cloro libre. El EDTA produce una pérdida inmediata del cloro libre de hasta del 80% al principio de la mezcla, incluso pequeñas cantidades de EDTA pueden afectar a la actividad del NaOCl (93, 193). Se ha observado que al mezclar 1% NaOCl con 17% EDTA en una proporción 1:1 disminuye el contenido de cloro libre sobre 1% (37, 38) y al mezclar una concentración mayor de NaOCl del 4% con la misma concentración de EDTA, se disminuye un 0,3% (38). Esto nos indica que, si vamos a combinarlo con EDTA, sería mejor emplearlo con altas concentraciones de hipoclorito de sodio. Sin embargo, otros autores refieren que, cuanto mayor es la cantidad de EDTA en la mezcla con el NaOCl, mayor es la reducción del cloro libre por lo que desaconsejan que el NaOCl sea utilizado con el EDTA (193).

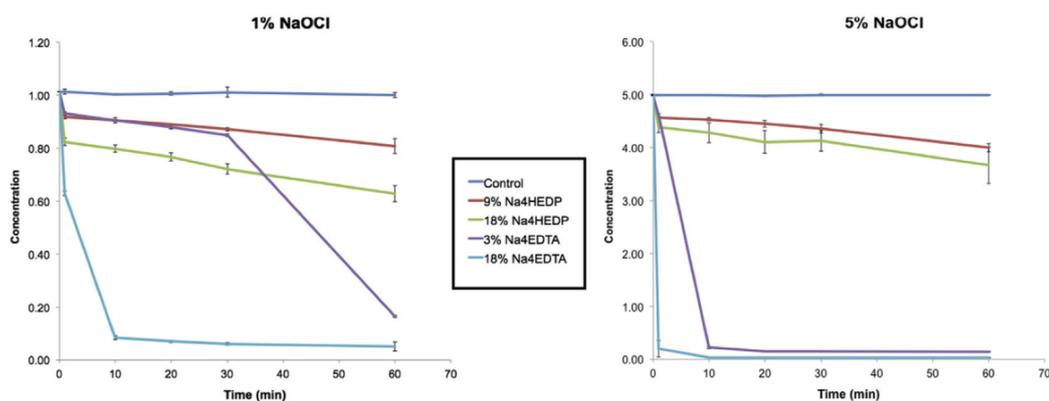
La no concordancia en la literatura sobre si el EDTA anula o no las propiedades antimicrobianas del hipoclorito de sodio NaOCl, se debe en nuestra opinión al tipo de sal de EDTA que se emplea (194, 195). Recordemos que la sal disódica de EDTA posee un pH ácido o cercano a neutro. Esta acidificación del medio interacciona con el hipoclorito de sodio reduciendo su actividad. Sin embargo, la sal tetrasódica del EDTA, posee un pH básico cercano a 11 que lo hace compatible con el hipoclorito de sodio sin alterar sus propiedades (77, 145, 146). Aunque algunos artículos especifican el tipo de sal empleada (77, 145, 146), la mayoría de los artículos no especifican si es sal disódica o tetrasódica, lo que dificulta una homogenización de un protocolo de irrigación final con EDTA.

En nuestro estudio se empleó sal disódica combinada con NaOCl al 5,25%, se esperó una hora para realizar el tratamiento para evaluar la interacción y, por los resultados obtenidos, parece que interfiere en su capacidad antimicrobiana.

## Discusión del ácido etidrónico

Los resultados obtenidos por el grupo formado por el HEDP con NaOCl 5,25% son los que mostraron la mayor eficacia, ya que las colonias se redujeron por completo o por debajo de niveles de detección, ya que en ninguna placa de las muestras hubo colonias. El HEDP por tanto resultó una mejor combinación que el EDTA.

Podemos resumir después de todo lo explicado hasta ahora que la actividad antimicrobiana del hipoclorito está relacionada directamente con el pH y la cantidad de cloro libre (196). Como sabemos que la sal disódica puede afectar en este sentido, autores han comparado el HEDP con una sal tetrasódica de EDTA, la cual, como hemos visto antes, mantiene un pH mejor y reduce su efecto sobre el cloro libre (71, 145). Biel y Cols, (77) basándose en que el HEDP en solución acuosa cuando se mezcla con NaOCl, no impide las propiedades antimicrobianas del NaOCl (69,71), lo compararon con esta sal (71, 145). Para ello investigaron varias sales quelantes con NaOCl a concentraciones de 1% y 5,25%, almacenaron estas mezclas en diferentes intervalos de tiempo, y luego evaluaron su eficacia. Los resultados mostraron que la sal tetrasódica del EDTA tiene cierta compatibilidad con el NaOCl, pero sólo en bajas concentraciones y a corto plazo. Esto puede ser útil cuando las dos soluciones están recién mezcladas (145), pero para la aplicación prevista en situación clínica, el HEDP parece mucho más adecuado (Figura 63-64).



**Figura 63.** Resultados obtenidos con dos concentraciones de NaOCl, La línea roja corresponde a HEDP al 9% quién muestra las mejores propiedades en un periodo de tiempo prolongado ya que mantiene estable la concentración de NaOCl y por tanto el cloro libre disponible (77).

Salt (wt/wt)	1 min	10 min	20 min	30 min	60 min
18% Na <sub>4</sub> HEDP					
Available chlorine (%)	95 ± 2	92 ± 2	88 ± 2	83 ± 2	72 ± 3
pH range	11.6	11.5–11.7	11.4–11.6	11.3–11.5	11.1–11.2
Temperature (°C)	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
9% Na <sub>4</sub> HEDP					
Available chlorine (%)	99 ± 1	97 ± 0	95 ± 0	93 ± 1	87 ± 3
pH range	11.0–11.2	11.1–11.2	11.1	11.0–11.1	10.9–11.0
Temperature (°C)	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0
18% Na <sub>4</sub> EDTA					
Available chlorine (%)	73 ± 1	10 ± 1	8 ± 0	7 ± 1	6 ± 2
pH range	11.2–11.5	9.8	9.7–9.8	9.7–9.8	9.7
Temperature (°C)	21 ± 1	25 ± 0	23 ± 0	22 ± 0	21 ± 1
3% Na <sub>4</sub> EDTA					
Available chlorine (%)	95 ± 1	93 ± 1	90 ± 1	87 ± 1	17 ± 0
pH range	12.1–12.6	12.1–12.2	11.5–12.0	11.5–11.9	9.7–9.8
Temperature (°C)	20 ± 1	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	23 ± 1
None (control)					
Available chlorine (%)	100 ± 1	99 ± 0	100 ± 1	100 ± 2	99 ± 1
pH range	11.7	11.6–11.8	11.7	11.7–11.8	11.6–11.8
Temperature (°C)	22 ± 1	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0

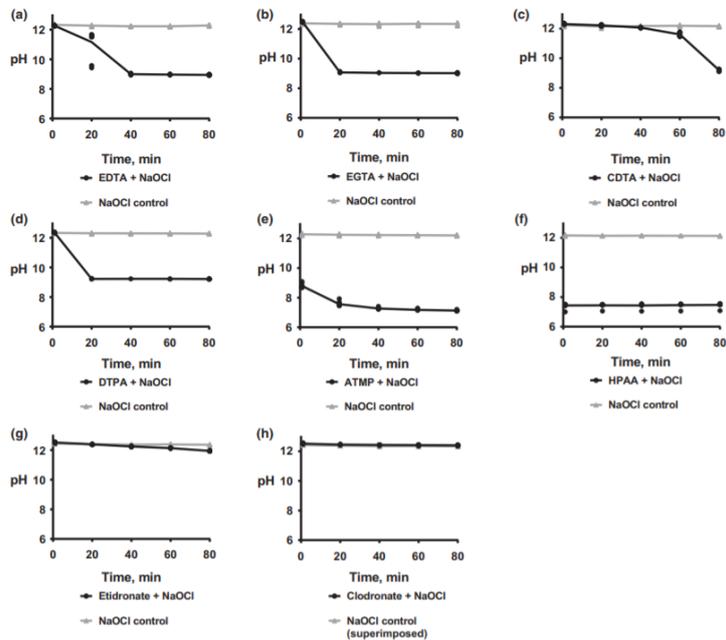
**Figura 64.** Imagen que nos muestra el Porcentaje de cloro libre disponible. Puede observarse que con el paso del tiempo va disminuyendo en los diferentes grupos, siendo el más constante el HEDP al 9% ya que varía menos el pH del medio, como vimos en la imagen anterior (77).

Wrighty cols (197) evaluaron con varios quelantes la interacción con el pH y cloro y libre. El objetivo del estudio era identificar qué quelantes se comportan mejor químicamente con el NaOCl, teniendo en cuenta los niveles de cloro libre disponible y la eliminación del barrillo dentinario para emplearlos en la quelación continua.

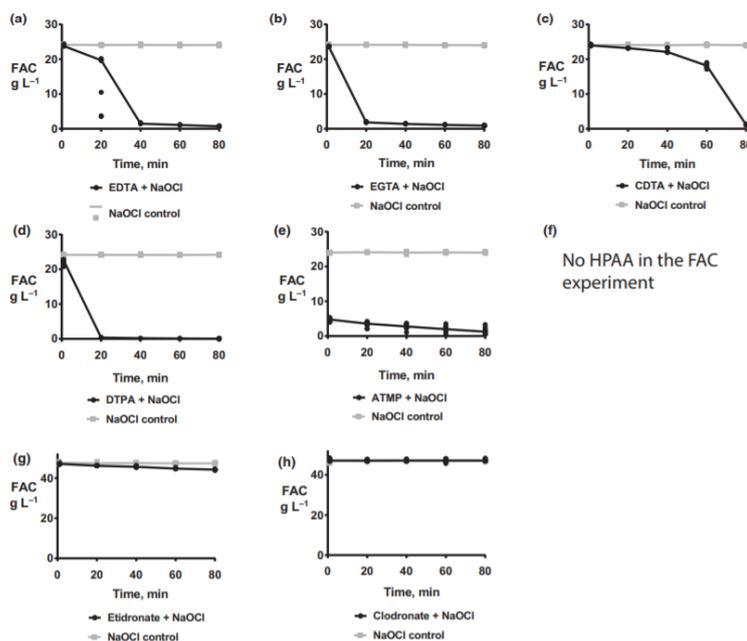
Se basaron en los estudios previos que incidían que el HEDP era el más indicado en asociación con el hipoclorito, pero vieron que los resultados hablaban de una caída en la concentración efectiva de NaOCl del 5% al 3,7% en 1 hora cuando se mezclaba con HEDP a la misma concentración (198), por lo que para su estudio añadieron otro quelante distinto, el clodronato.

El clodronato, es un bifosfonato de primera generación, que se ha utilizado entre otras cosas para el tratamiento de la osteoporosis, la enfermedad de Paget, osteoartritis e hipercalcemia maligna (199). Existe una amplia investigación médica sobre su seguridad y eficacia (199-201). El clodronato inhibe la actividad osteoclástica y es antiinflamatorio (200), siendo ambas propiedades ventajas potenciales para un irrigante endodóntico. Además, se ha visto que posee cierta actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* (202). No obstante, es un

fármaco que en mujeres en estado de embarazo o edad fértil debería evitarse su empleo (203). Los resultados que obtuvieron a diferentes tiempos y temperatura, para evaluar el pH y el cloro libre indicaron que el etidrónico y el clodronato tenían un comportamiento muy superior al EDTA. Estos gráficos muestran los datos (Figura 65-66).



**Figura 65.** La figura (G) y (H) corresponden al Etidrónico y Clodronato los cuales mantienen el pH constante durante intervalos de tiempo prolongado, esto es muy importante como hemos visto previamente para la disponibilidad de Cloro libre disponible, a pH constante menor variación en la disponibilidad (197).



**Figura 66.** La cantidad de cloro disponible, en combinación del quelante con el NaOCl se muestra constante en (G) (etidrónico) y (H) (clodronato) en intervalos prolongados de tiempo en comparación con los otros quelantes (197).

La razón de la mejor compatibilidad de los quelantes clodronato y HEDP en comparación con el EDTA es que son quelantes no nitrogenados que contienen fósforo (P) en lugar de Nitrógeno (N). En el NaOCl, el cloro esencialmente lleva una carga positiva y atacará centros electrofílicos de los átomos de nitrógeno (78), el fósforo es menos electronegativo que el nitrógeno por lo que es menos probable que reaccione con NaOCl.

Aunque el clodronato tiene un potencial de uso en la quelación continua, no investigaron aspectos importantes como la capacidad de disolución de tejidos orgánicos o capacidad antimicrobiana, ni su seguridad clínica ya que fue un estudio realizado in vitro. Sí podemos constatar que la comparación del HEDP con el EDTA al asociarlo con NaOCl muestra una mejor asociación y por tanto debe ser la primera opción indicada.

### **Discusión sobre activación ultrasónica pasiva (PUI) y Endo XP finisher (XPF)**

Los irrigantes que se emplearon en nuestro estudio fueron divididos en subgrupos para ser activados aleatoriamente con PUI o con XPF. En ninguno de los grupos vimos diferencias significativas, aunque si apreciamos una disminución ligeramente mayor en el grupo activado con PUI (**Tabla 10**).

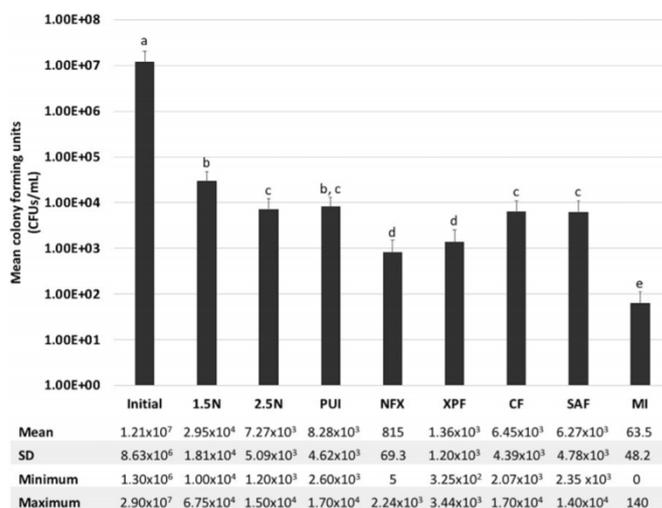
	Total	XPF	PUI
Control	9,82E+03	1,45E+01	1,32E+01
EDTA	1,68E+02	1,96E+02	1,43E+02
EDTA y NaOCl	1,39E+01	1,45E+01	1,32E+01
HEDP y NaOCl	1	1	1
PBS	6,58E+03	8,33E+03	4,82E+03

**Tabla 10.** Media de los resultados obtenidos en nuestro estudio de colonias según el grupo de trabajo comparados con el grupo control.

La activación con PUI es la más importante y usada en endodoncia (83). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que la activación con XPF puede lograr resultados parecidos. La XPF es un instrumento relativamente nuevo y hay pocos estudios comparándola con PUI en la reducción de biofilm.

A priori la XPF puede ser más ventajosa ya que en nuestro estudio ha tenido una resistencia a la fatiga mayor que las puntas de activación PUI ya que no se nos rompió ninguna lima mientras que para la irrigación ultrasónica pasiva (PUI), necesitamos 5 puntas debido a que la fatiga de trabajo fracturó varios instrumentos. Además, tiene mayor comodidad de empleo al no tener que portar un equipo ultrasónico de limpieza, ya que la XPF se puede adaptar directamente al motor de endodoncia.

Parnwad y cols (204) (**Figura 67**) definían la XPF como una buena alternativa gracias a su fina punta que trabaja minuciosamente las paredes del conducto radicular (83). Realizaron un estudio in vitro para evaluar y comparar la eficacia de diferentes métodos de activación para la desinfección en conductos radiculares infectados con *E.faecalis*. Compararon diferentes técnicas de activación como son, PUI, XPF, navitip FX, lima de autoajuste (SAF), lima circunferencial (CF) y la activación con instrumentación mecánica (MI) (89, 205). Los resultados que obtuvieron fueron muy similares entre todos ellos a excepción de la activación con instrumentación mecánica manual.



**Figura 67.** Comparación de las diferentes técnicas de activación con las colonias remanentes después del tratamiento. Nos interesa las columnas PUI y XPF ya que presentan resultados parecidos (204).

Sí comprobaron que la activación con PUI y NFX eran más conservadoras con las paredes del conducto radicular ya que desgastaban menos y había menos pérdida de dentina (89, 206).

Una diferencia importante de la XPF frente a las otras técnicas de irrigación es su flexibilidad y su punta fina de trabajo que le permite contactar efectivamente en los conductos radiculares no uniformes, dando mejores resultados con respecto al PUI, NFX y SAF, ya que estos son más rígidos (207). Otros estudios comparaban la efectividad de la XPF con técnicas sónicas y mostraron que, en comparación con la irrigación tradicional o la activación sónica y ultrasónica, la XPF fue más efectiva en la disminución de bacterias presentes en los túbulos dentinarios (85, 160). Por último, parece que la activación con XPF tiene mayor control del irrigante, lo que impide que se extruya irrigante al periápice frente a la activación PUI (89, 208).

PingPingBao y cols (160) propusieron combinar estas dos técnicas PUI y XPF con irrigación de NaOCl al 3% y EDTA y dieron como resultado un 95% con PUI y un 99% con XPF de eficacia en la reducción de bacterias tras 4 semanas de incubación. AdhamAzim y cols (85) utilizó NaOCl al 6% y EDTA y los resultados fueron similares con XPF 98% después de 3 semanas. B Bhuva y cols (138) utilizaron NaOCl al 1% después de tres días de incubación con PUI y tuvieron una reducción del 99% de las bacterias. Ambas técnicas de activación producen resultados similares.

Los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental indican que la activación con XPF puede conseguir resultados similares a los conseguidos con PUI. La adecuación de la XPF o la PUI a la situación clínica debe determinarse in situ.

Como resumen, entendemos que la relevancia clínica de nuestro estudio, a la vista de los resultados obtenidos, es que parece factible la combinación de NaOCl con un agente quelante, preferiblemente débil, como el HEDP, aplicado en varios ciclos. Esto va a permitir disolver al mismo tiempo la materia orgánica e inorgánica, eliminar los restos inorgánicos y el barrillo dentinario formados durante la conformación durante la instrumentación, evitando que se acumulen en las paredes dentinarias y en las irregularidades del sistema de conductos lo

que va a facilitar una mayor difusión del irrigante y por tanto una mayor desinfección de las superficies.

Líneas de investigación futuras son necesarias desarrollar de nuevos coadyuvantes que ayuden a mejorar las capacidades del EDTA, como pueden ser péptidos o la cetrimida, así como la investigación de nuevos quelantes como el Clorodronato para combinarlo con el NaOCl y aumentar los porcentajes de desinfección.

# **CONCLUSIONES**

Teniendo en cuenta las limitaciones de nuestro estudio *in vitro*, en el que se han utilizado dientes humanos permanentes infectados con Biofilm de *E.faecalis*, aplicando diferentes tratamientos para su desinfección y teniendo precauciones en la extrapolación de los resultados a la clínica, podemos concluir que:

- 1- El **EDTA** por sí solo tiene un poder antimicrobiano débil, reduciendo los niveles bacterianos principalmente por arrastre mecánico, pero no lo suficiente como para plantearse una irrigación única con **EDTA** en el protocolo de irrigación final.
- 2- La combinación de **EDTA** en combinación con **NaOCl al 5,25%** activado, parece tener buena actividad antibacteriana, pero no parece un irrigante adecuado para protocolo de irrigación final porque la desinfección no es completa y siguen quedando colonias remanentes.
- 3- La combinación de **HEDP** con **NaOCl al 5,25%** activado, reduce la carga bacteriana por debajo de niveles de detección lo que lo convierte en el quelante ideal para usarlo en protocolo de irrigación final.
- 4- No hay diferencias significativas entre la activación mediante activación **PUI** y activación mediante **XPF** independientemente del irrigante usado.
- 5- El *Enterococcus faecalis* es susceptible a todos los irrigantes, pero solamente el **HEDP** ha sido capaz de reducirlo por debajo de niveles de detección.

# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Peters OA, Laib A, Gohring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod.* 2001;27(1):1-6.
2. Nikiforuk G, Sreebny L. Demineralization of hard tissues by organic chelating agents at neutral pH. *J Dent Res.* 1953;32(6):859-67.
3. Azim AA, Piasecki L, da Silva Neto UX, Cruz ATG, Azim KA. XP Shaper, A Novel Adaptive Core Rotary Instrument: Micro-computed Tomographic Analysis of Its Shaping Abilities. *J Endod.* 2017;43(9):1532-8.
4. Zhao D, Shen Y, Peng B, Haapasalo M. Root canal preparation of mandibular molars with 3 nickel-titanium rotary instruments: a micro-computed tomographic study. *J Endod.* 2014;40(11):1860-4.
5. Aksoy C, Keris EY, Yaman SD, Ocak M, Geneci F, Celik HH. Evaluation of XP-endo Shaper, Reciproc Blue, and ProTaper Universal NiTi Systems on Dentinal Microcrack Formation Using Micro-Computed Tomography. *J Endod.* 2019;45(3):338-42.
6. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, et al. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod.* 2003;29(3):170-5.
7. Fischer GM, Evans CE. A three-rooted mandibular second premolar. *Gen Dent.* 1992;40(2):139-40.
8. Grossman LI. Polyantibiotic treatment of pulpless teeth. *J Am Dent Assoc.* 1951;43(3):265-78.
9. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006;32(5):389-98.
10. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981;89(4):321-8.
11. Rosenfeld EF, James GA, Burch BS. Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. *J Endod.* 1978;4(5):140-6.
12. Abou-Rass M, Patonai FJ, Jr. The effects of decreasing surface tension on the flow of irrigating solutions in narrow root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;53(5):524-6.
13. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez A, Llamas R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. *J Endod.* 1996;22(7):337-40.

14. Buttler TK, Crawford JJ. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. *J Endod.* 1982;8(2):59-66.
15. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod.* 1985;11(12):525-8.
16. Nieuwenhuijsen MJ, Toledano MB, Eaton NE, Fawell J, Elliott P. Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occup Environ Med.* 2000;57(2):73-85.
17. McLaughlin LA, Levy K, Beck NK, Shin GA, Meschke JS, Eisenberg JN. An observational study on the effectiveness of point-of-use chlorination. *J Environ Health.* 2009;71(8):48-53.
18. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.
19. Nicoletti MA, Siqueira EL, Bombana AC, Oliveira GG. Shelf-life of a 2.5% sodium hypochlorite solution as determined by Arrhenius equation. *Braz Dent J.* 2009;20(1):27-31.
20. Varise TG, Estrela C, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pecora JD. Detection of organochlorine compounds formed during the contact of sodium hypochlorite with dentin and dental pulp. *Braz Dent J.* 2014;25(2):109-16.
21. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006;39(11):878-85.
22. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983;55(3):307-12.
23. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod.* 2006;32(5):434-7.
24. Spano JC, Barbin EL, Santos TC, Guimaraes LF, Pecora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. *Braz Dent J.* 2001;12(3):154-7.
25. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002;28(3):181-4.

26. Kamburis JJ, Barker TH, Barfield RD, Eleazer PD. Removal of organic debris from bovine dentin shavings. *J Endod.* 2003;29(9):559-61.
27. 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(9):669-71.
28. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod.* 1975;1(7):238-42.
29. Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endod.* 1984;10(10):477-83.
30. Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. *J Endod.* 1983;9(4):137-42.
31. Cameron JA. The use of ultrasonics in the removal of the smear layer: a scanning electron microscope study. *J Endod.* 1983;9(7):289-92.
32. Gilboe DB, Svare CW, Thayer KE, Drennon DG. Dentinal smearing: an investigation of the phenomenon. *J Prosthet Dent.* 1980;44(3):310-6.
33. Drake DR, Wiemann AH, Rivera EM, Walton RE. Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. *J Endod.* 1994;20(2):78-82.
34. Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J.* 2010;43(1):2-15.
35. Kwang S, Abbott P. The presence and distribution of bacteria in dentinal tubules of root filled teeth. *Int Endod J.* 2014;47(6):600-10.
36. Brannstrom M, Johnson G. Effects of various conditioners and cleaning agents on prepared dentin surfaces: a scanning electron microscopic investigation. *J Prosthet Dent.* 1974;31(4):422-30.
37. Oksan T, Aktener BO, Sen BH, Tezel H. The penetration of root canal sealers into dentinal tubules. A scanning electron microscopic study. *Int Endod J.* 1993;26(5):301-5.
38. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6(4):142-9.

39. Pashley DH. Smear layer: overview of structure and function. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88 Suppl 1:215-24.
40. Grossman LI, Oliet S, Del Río CE. *Endodontic Practice.* 11 ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.
41. Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J.* 2003;36(12):810-30.
42. Weine FS. *Endodontic Therapy.* 4th ed. St Louis. USA: C.V. Mosby; 1988.
43. O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC. A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *J Endod.* 2000;26(12):739-43.
44. Berg MS, Jacobsen EL, BeGole EA, Remeikis NA. A comparison of five irrigating solutions: a scanning electron microscopic study. *J Endod.* 1986;12(5):192-7.
45. Di Lenarda R, Cadenaro M, Sbaizero O. Effectiveness of 1 mol L<sup>-1</sup> citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. *Int Endod J.* 2000;33(1):46-52.
46. Kotula R, Bordacova J. [The effect of ethylenediaminetetraacetic acid on the oral microflora]. *Dtsch Stomatol.* 1969;19(8):575-81.
47. Nygaard-Ostby B. Chelation in root canal therapy: ethylenediaminetetraacetic acid for cleansing and widening of root canals. *Odontol Tidskr.* 1957;65:3-11.
48. Pawlicka H, Piatkowska D, Hajdukiewicz G. [Effectiveness of cleansing agents in root canal preparation. A scanning electron microscopy study]. *Stomatol DDR.* 1981;31(9):684-8.
49. Patterson SS. In vivo and in vitro studies of the effect of the disodium salt of ethylenediamine tetra-acetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1963;16:83-103.
50. Weinreb MM, Meier E. The Relative Efficiency of Edta, Sulfuric Acid, and Mechanical Instrumentation in the Enlargement of Root Canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;19:247-52.
51. Fromme HG, Guttzeit R, Riedel H. [Experimental studies on the question of mechanical and chemical root canal preparation and on the adhesiveness of root canal filling materials]. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1970;25(9):865-76.

52. Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1(5):176-9.
53. Mjor IA, Smith MR, Ferrari M, Mannocci F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int Endod J.* 2001;34(5):346-53.
54. Mjor IA, Sveen OB, Heyeraas KJ. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int.* 2001;32(6):427-46.
55. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7(2):104-33.
56. Fogel HM, Pashley DH. Dentin permeability: effects of endodontic procedures on root slabs. *J Endod.* 1990;16(9):442-5.
57. Scelza MF, Antoniazzi JH, Scelza P. Efficacy of final irrigation--a scanning electron microscopic evaluation. *J Endod.* 2000;26(6):355-8.
58. Calt S, Serper A. Smear layer removal by EGTA. *J Endod.* 2000;26(8):459-61.
59. Hottel TL, el-Refai NY, Jones JJ. A comparison of the effects of three chelating agents on the root canals of extracted human teeth. *J Endod.* 1999;25(11):716-7.
60. Brannstrom M. Smear layer: pathological and treatment considerations. *Oper Dent Suppl.* 1984;3:35-42.
61. Guignes P, Faure J, Maurette A. Relationship between endodontic preparations and human dentin permeability measured in situ. *J Endod.* 1996;22(2):60-7.
62. Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. *J Endod.* 1995;21(12):592-3.
63. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985;18(1):35-40.
64. Yang SE, Bae KS. Scanning electron microscopy study of the adhesion of *Prevotella nigrescens* to the dentin of prepared root canals. *J Endod.* 2002;28(6):433-7.
65. Yamashita JC, Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. *Int Endod J.* 2003;36(6):391-4.

66. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J.* 2003;36(6):411-7.
67. Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone.* 1999;25(1):97-106.
68. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod.* 2005;31(11):817-20.
69. Tartari T, Guimaraes BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA, Bramante CM. Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *Int Endod J.* 2015;48(4):399-404.
70. Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J.* 2009;42(4):335-43.
71. Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. *J Endod.* 2014;40(12):1999-2002.
72. De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J, Jr., et al. Longitudinal co-site optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. *J Endod.* 2008;34(1):71-5.
73. Tartari T, Duarte Junior AP, Silva Junior JO, Klautau EB, Silva ESJMH, Silva ESJPA. Etidronate from medicine to endodontics: effects of different irrigation regimes on root dentin roughness. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(5):409-15.
74. Hulsmann M, Heckendorff M, Schafers F. Comparative in-vitro evaluation of three chelator pastes. *Int Endod J.* 2002;35(8):668-79.
75. Scelza MF, Teixeira AM, Scelza P. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% citric acid, and 17% EDTA on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(2):234-6.
76. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod.* 2002;28(1):17-9.
77. Biel P, Mohn D, Attin T, Zehnder M. Interactions between the Tetrasodium Salts of EDTA and 1-Hydroxyethane 1,1-Diphosphonic Acid with Sodium Hypochlorite Irrigants. *J Endod.* 2017;43(4):657-61.

78. Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci.* 2006;11(4):147-57.
79. Arias-Moliz MT, Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Baca P. Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid. *J Endod.* 2016;42(5):771-5.
80. Estrela C, Costa ESR, Urban RC, Goncalves PJ, Silva JA, Estrela CRA, et al. Demetallization of *Enterococcus faecalis* biofilm: a preliminary study. *J Appl Oral Sci.* 2018;(26):703-74.
81. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008;34(11):1291-301.
82. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Rodriguez E, Liebana-Urena J, Espigares-Garcia M. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(2):84-9.
83. Caputa PE, Retsas A, Kuijk L, Chavez de Paz LE, Boutsoukis C. Ultrasonic Irrigant Activation during Root Canal Treatment: A Systematic Review. *J Endod.* 2019;45(1):31-44.
84. Boutsoukis C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Wesselink PR, van der Sluis LW. Evaluation of irrigant flow in the root canal using different needle types by an unsteady computational fluid dynamics model. *J Endod.* 2010;36(5):875-9.
85. Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GT. Efficacy of 4 Irrigation Protocols in Killing Bacteria Colonized in Dentinal Tubules Examined by a Novel Confocal Laser Scanning Microscope Analysis. *J Endod.* 2016;42(6):928-34.
86. van der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J.* 2006;39(6):472-6.
87. Ruddle CJ. Endodontic Disinfection: The Sonic Advantage. *Dent Today.* 2017;36(6):84, 6-7.
88. Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009;35(6):791-804.

89. an der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J.* 2007;40(6):415-26.
90. Kurzmann C, Meire MA, Lettner S, Farmakis ETR, Moritz A, De Moor RJG. The efficacy of ultrasonic and PIPS (photon-induced acoustic streaming) irrigation to remove artificially placed dentine debris plugs out of an artificial and natural root model. *Lasers Med Sci.* 2020;35(3):719-28.
91. Robinson JP, Macedo RG, Verhaagen B, Versluis M, Cooper PR, van der Sluis LWM, et al. Cleaning lateral morphological features of the root canal: the role of streaming and cavitation. *Int Endod J.* 2018;51 Suppl (1):55-64.
92. Doinikov AA, Thibault P, Marmottant P. Acoustic streaming induced by two orthogonal ultrasound standing waves in a microfluidic channel. *Ultrasonics.* 2018;87:7-19.
93. Walters MJ, Baumgartner JC, Marshall JG. Efficacy of irrigation with rotary instrumentation. *J Endod.* 2002;28(12):837-9.
94. Pitt WG. Removal of oral biofilm by sonic phenomena. *Am J Dent.* 2005;18(5):345-52.
95. Barnett F, Godick B, Tronstad L. Clinical suitability of a sonic vibratory endodontic instrument. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1(2):77-81.
96. De Paolis G, Vincenti V, Prencipe M, Milana V, Plotino G. Ultrasonics in endodontic surgery: a review of the literature. *Ann Stomatol (Roma).* 2010;1(2):6-10.
97. Martin H. Ultrasonic disinfection of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976;42(1):92-9.
98. Sabins RA, Johnson JD, Hellstein JW. A comparison of the cleaning efficacy of short-term sonic and ultrasonic passive irrigation after hand instrumentation in molar root canals. *J Endod.* 2003;29(10):674-8.
99. Stamos DE, Sadeghi EM, Haasch GC, Gerstein H. An in vitro comparison study to quantitate the debridement ability of hand, sonic, and ultrasonic instrumentation. *J Endod.* 1987;13(9):434-40.
100. Weller RN, Brady JM, Bernier WE. Efficacy of ultrasonic cleaning. *J Endod.* 1980;6(9):740-3.

101. Burluson A, Nusstein J, Reader A, Beck M. The in vivo evaluation of hand/rotary/ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars. *J Endod.* 2007;33(7):782-7.
102. Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The efficacy of ultrasonic irrigation to remove artificially placed dentine debris from different-sized simulated plastic root canals. *Int Endod J.* 2004;37(9):607-12.
103. Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J.* 2004;37(10):672-8.
104. Torabinejad M, Kutsenko D, Machnick TK, Ismail A, Newton CW. Levels of evidence for the outcome of nonsurgical endodontic treatment. *J Endod.* 2005;31(9):637-46.
105. Hardie JM. Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. *Br Dent J.* 1992;172(7):271-8.
106. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections - an update. *APMIS.* 2017;125(4):376-84.
107. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):70-7.
108. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod.* 2010;36(1):70-7.
109. Arweiler NB, Netuschil L. The Oral Microbiota. *Adv Exp Med Biol.* 2016;902:45-60.
110. Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. *Biomed J.* 2013;36(2):59-70.
111. Dufour D, Levesque CM. Bacterial behaviors associated with the quorum-sensing peptide pheromone ('alarmone') in streptococci. *Future Microbiol.* 2013;8(5):593-605.
112. Figuero E, Nobrega DF, Garcia-Gargallo M, Tenuta LM, Herrera D, Carvalho JC. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2017;44 Suppl 18:(1)16-34.
113. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986;13(10):905-11.

114. Loesche WJ. Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease. In: th, Baron S, editors. Medical Microbiology. Galveston (TX)1996.
115. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev. 1976;9:65-107.
116. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res. 1994;8(2):263-71.
117. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology (Reading). 2003;149(2):279-94.
118. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002;15(2):167-93.
119. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. Trends Microbiol. 2003;11(2):94-100.
120. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010;8(9):623-33.
121. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence. 2011;2(5):435-44.
122. Muras A, Otero-Casal P, Blanc V, Otero A. Acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing in the oral cavity: a paradigm revisited. Sci Rep. 2020;10(1):9800.
123. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. J Endod. 1990;16(10):498-504.
124. Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. 2008;34(5):537-40.
125. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microbiol Immunol. 2003;18(2):100-3.
126. Ike Y. Pathogenicity of Enterococci. Nihon Saikingaku Zasshi. 2017;72(2):189-211.
127. Remington A, Turner CE. The DNases of pathogenic Lancefield streptococci. Microbiology. 2018;164(3):242-50.

128. Schleifer KH, Kilpper-Balz R, Kraus J, Gehring F. Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and "mutans-like" streptococci. *J Dent Res*. 1984;63(8):1047-50.
129. Santo Domingo JW, Siefring SC, Haugland RA. Real-time PCR method to detect *Enterococcus faecalis* in water. *Biotechnol Lett*. 2003;25(3):261-5.
130. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2005;31(12):867-72.
131. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004;30(5):315-20.
132. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002;28(10):689-93.
133. Kishen A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2006;77(2):406-15.
134. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod*. 2007;33(8):917-25.
135. Harrison JW, Hand RE. The effect of dilution and organic matter on the antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 1981;7(3):128-32.
136. van der Sluis LW, Vogels MP, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. *J Endod*. 2010;36(4):737-40.
137. Huang TY, Gulabivala K, Ng YL. A bio-molecular film ex-vivo model to evaluate the influence of canal dimensions and irrigation variables on the efficacy of irrigation. *Int Endod J*. 2008;41(1):60-71.
138. Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J*. 2010;43(3):241-50.
139. Wiseman A, Cox TC, Paranjpe A, Flake NM, Cohenca N, Johnson JD. Efficacy of sonic and ultrasonic activation for removal of calcium hydroxide from mesial

- canals of mandibular molars: a microtomographic study. *J Endod.* 2011;37(2):235-8.
140. Zou L, Shen Y, Li W, Haapasalo M. Penetration of sodium hypochlorite into dentin. *J Endod.* 2010;36(5):793-6.
141. Alsilani R, Jadu F, Bogari DF, Jan AM, Alhazzazi TY. Single file reciprocating systems: A systematic review and meta-analysis of the literature: Comparison of reciproc and WaveOne. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6(5):402-9.
142. Arias A, Lee YH, Peters CI, Gluskin AH, Peters OA. Comparison of 2 canal preparation techniques in the induction of microcracks: a pilot study with cadaver mandibles. *J Endod.* 2014;40(7):982-5.
143. Jamleh A, Alfadley A, Alfouzan K. Vertical Force Induced with WaveOne and WaveOne Gold Systems during Canal Shaping. *J Endod.* 2018;44(9):1412-5.
144. Brunson M, Heilborn C, Johnson DJ, Cohenca N. Effect of apical preparation size and preparation taper on irrigant volume delivered by using negative pressure irrigation system. *J Endod.* 2010;36(4):721-4.
145. Tartari T, Oda DF, Zancan RF, da Silva TL, de Moraes IG, Duarte MA, et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J.* 2017;50(1):106-14.
146. Tartari T, Bachmann L, Zancan RF, Vivian RR, Duarte MAH, Bramante CM. Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. *Int Endod J.* 2018;51 Suppl (1):42-54.
147. Siqueira JF, Jr., Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998;24(6):414-6.
148. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod.* 2011;37(3):363-6.
149. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod.* 2003;29(6):400-3.

150. Mello I, Robazza CR, Antoniazzi JH, Coil J. Influence of different volumes of EDTA for final rinse on smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(5):40-3.
151. Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981;52(2):197-204.
152. Wright PP, Kahler B, Walsh LJ. The Effect of Heating to Intracanal Temperature on the Stability of Sodium Hypochlorite Admixed with Etidronate or EDTA for Continuous Chelation. *J Endod.* 2019;45(1):57-61.
153. Gutarts R, Nusstein J, Reader A, Beck M. In vivo debridement efficacy of ultrasonic irrigation following hand-rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod.* 2005;31(3):166-70.
154. Alacam T. Scanning electron microscope study comparing the efficacy of endodontic irrigating systems. *Int Endod J.* 1987;20(6):287-94.
155. Carver K, Nusstein J, Reader A, Beck M. In vivo antibacterial efficacy of ultrasound after hand and rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod.* 2007;33(9):1038-43.
156. Munley PJ, Goodell GG. Comparison of passive ultrasonic debridement between fluted and nonfluted instruments in root canals. *J Endod.* 2007;33(5):578-80.
157. Verma N, Sangwan P, Tewari S, Duhan J. Effect of Different Concentrations of Sodium Hypochlorite on Outcome of Primary Root Canal Treatment: A Randomized Controlled Trial. *J Endod.* 2019;45(4):357-63.
158. Jensen SA, Walker TL, Hutter JW, Nicoll BK. Comparison of the cleaning efficacy of passive sonic activation and passive ultrasonic activation after hand instrumentation in molar root canals. *J Endod.* 1999;25(11):735-8.
159. Cameron JA. The effect of ultrasonic endodontics on the temperature of the root canal wall. *J Endod.* 1988;14(11):554-9.
160. Bao P, Shen Y, Lin J, Haapasalo M. In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals. *J Endod.* 2017;43(2):321-5.
161. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31(1):1-7.

162. Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(5):579-86.
163. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(2):71-6.
164. Vidana R, Sullivan A, Billstrom H, Ahlquist M, Lund B. *Enterococcus faecalis* infection in root canals - host-derived or exogenous source? *Lett Appl Microbiol.* 2011;52(2):109-15.
165. 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(2):93-8.
166. Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(1):112-8.
167. Baumgartner JC, Siqueira JF, Jr., Xia T, Rocas IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2004;30(3):141-4.
168. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1):86-93.
169. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36(1):1-11.
170. Molander A, Lundquist P, Papapanou PN, Dahlen G, Reit C. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from the root canal. *Int Endod J.* 2002;35(1):1-6.
171. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent.* 2003;31(5):333-9.
172. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(4):462-78.
173. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34(5):399-405.

174. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(4):234-9.
175. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987;66(8):1375-9.
176. Barroso Ldos S, Habitante SM, Jorge AO, Faria Ida S. Microorganisms growth in endodontic citric-acid solutions with and without microbiological stabilizer. *J Endod.* 2004;30(1):42-4.
177. Korstgens V, Flemming HC, Wingender J, Borchard W. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci Technol.* 2001;43(6):49-57.
178. Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(3):2064-9.
179. Cavaliere R, Ball JL, Turnbull L, Whitchurch CB. The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable *Hemophilus influenzae* biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. *Microbiologyopen.* 2014;3(4):557-67.
180. Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2012;38(6):826-8.
181. Yilmaz Z, Basbag B, Buzoglu HD, Gumusderelioglu M. Effect of low-surface-tension EDTA solutions on the wettability of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;111(1):109-14.
182. Wang D, Shen Y, Ma J, Hancock REW, Haapasalo M. Antibiofilm Effect of D-enantiomeric Peptide Alone and Combined with EDTA In Vitro. *J Endod.* 2017;43(11):1862-7.
183. de Almeida J, Hoogenkamp M, Felipe WT, Crielaard W, van der Waal SV. Effectiveness of EDTA and Modified Salt Solution to Detach and Kill Cells from *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod.* 2016;42(2):320-3.
184. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J.* 2012;45(2):162-8.

185. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod.* 2009;35(5):711-4.
186. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of Enterococcus faecalis by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod.* 2006;32(2):138-41.
187. 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(4):363-71.
188. 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(1):280-6.
189. Mohammadi Z, Giardino L, Palazzi F. Evaluation of the antifungal activity of four solutions used as a final rinse in vitro. *Aust Endod J.* 2013;39(1):31-4.
190. Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J.* 2002;35(11):934-9.
191. Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on Enterococcus faecalis-infected root canals. *J Endod.* 2011;37(8):1121-3.
192. Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod.* 2015;41(12):1975-84.
193. McGill S, Gulabivala K, Mordan N, Ng YL. The efficacy of dynamic irrigation using a commercially available system (RinsEndo) determined by removal of a collagen 'bio-molecular film' from an ex vivo model. *Int Endod J.* 2008;41(7):602-8.
194. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilms. *J Endod.* 2006;32(6):527-31.
195. Schoeffel GJ. The EndoVac method of endodontic irrigation: safety first. *Dent Today.* 2007;26(10):92, 4, 6.
196. Aubut V, Pommel L, Verhille B, Orsiere T, Garcia S, About I, et al. Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(2):120-5.

197. Wright PP, Cooper C, Kahler B, Walsh LJ. From an assessment of multiple chelators, clodronate has potential for use in continuous chelation. *Int Endod J.* 2020;53(1):122-34.
198. Zollinger A, Mohn D, Zeltner M, Zehnder M. Short-term storage stability of NaOCl solutions when combined with Dual Rinse HEDP. *Int Endod J.* 2018;51(6):691-6.
199. Frediani B, Bertoldi I. Clodronate: new directions of use. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2015;12(2):97-108.
200. Atula ST, Tahtela RK, Nevalainen JI, Pylkkanen LH. Clodronate as a single-dose intravenous infusion effectively provides short-term correction of malignant hypercalcemia. *Acta Oncol.* 2003;42(7):735-40.
201. Frith JC, Monkkonen J, Auriola S, Monkkonen H, Rogers MJ. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2001;44(9):2201-10.
202. Kruszewska H, Zareba T, Tyski S. Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Pol Pharm.* 2002;59(6):436-9.
203. Stathopoulos IP, Liakou CG, Katsalira A, Trovas G, Lyritis GG, Papaioannou NA, et al. The use of bisphosphonates in women prior to or during pregnancy and lactation. *Hormones (Athens).* 2011;10(4):280-91.
204. Sasanakul P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Influence of Adjuncts to Irrigation in the Disinfection of Large Root Canals. *J Endod.* 2019;45(3):332-7.
205. Al-Hadlaq SM, Al-Turaiki SA, Al-Sulami U, Saad AY. Efficacy of a new brush-covered irrigation needle in removing root canal debris: a scanning electron microscopic study. *J Endod.* 2006;32(12):1181-4.
206. Kocak S, Kocak MM, Saglam BC, Aktas E. Efficacy of three irrigation agitation techniques on bacterial elimination: a microbiologic and microscopic evaluation. *Scanning.* 2014;36(5):512-6.
207. Leoni GB, Versiani MA, Silva-Sousa YT, Bruniera JF, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. *Int Endod J.* 2017;50(4):398-406.

208. Azim AA, Aksel H, Margaret Jefferson M, Huang GT. Comparison of sodium hypochlorite extrusion by five irrigation systems using an artificial root socket model and a quantitative chemical method. *Clin Oral Investig.* 2018;22(2):1055-61.

# **ANEXO I**

# ABREVIATURAS UTILIZADAS

**°C:** grados centígrados.

**AHL:** autoinductor, N-acil homoserina lactona.

**BHI:** *brain heart infusión* medio de cultivo general bacteriano.

**Ca:** Calcio.

**CBCT:** tomografía computarizada de haz cónico.

**CFU:** unidades formadoras de colonias.

**Cl:** Cloro.

**ClO:** ión hipoclorito.

**Co:** Cobalto.

**DR:** Dual Rinse, nombre comercial del irrigante ácido etidróico.

**EDTA:** ácido etilendiaminotetracético.

**EPS:** matriz polimérica extracelular.

**FAC:** Cloro libre disponible.

**Fe:** Hierro.

**HEDP:** ácido etidróico.

**HOCL:** ácido hipocloroso.

**Khz:** Kilohercios

**McF:** Mcfarland, unidad de medida de la turbidez de un líquido.

**mm<sup>2</sup>:** unidad de medida, milímetros cuadrados.

**Mn:** Manganeseo.

**N:** Nitrógeno.

**Na:** Sodio.

**Na<sub>2</sub>EDTA:** sal disódica de EDTA.

**NA<sub>4</sub>EDTA:** sal tetrasódica de EDTA.

**NaOCl:** Hipoclorito de Sodio.

**OH:** grupo hidroxilo.

**PBS:** tampón o *buffer* de fosfato salino.

**pH:** potencial de hidrógeno.

**PUI:** activación ultrasónica pasiva.

**SEM:** microscopio electrónico de barrido.

**SH:** grupo sulfhidrilo.

**WWG:** wave one gold.

**XPF:** XP-endo finisher.

**μCT:** microCBCT.

**μm:** unidad de medida, micra.

## **ANEXO II**

## **Publicación en Dentistry Journal**

**Álvarez-Sagüés A, Herce N, Amador U, Llinares-Pinel F, Nistal-Villán E, Presa J, Álvarez L, Azabal M.** Efficacy of EDTA and HEDP Chelators in the Removal of Mature Biofilm of *Enterococcus faecalis* by PUI and XPF File activation. *Dent J (Basel)*.2021.Apr 9;9(4):41.