



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina

**ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE:
N-ACETILCISTEÍNA VS HIPOCLORITO DE SODIO Y EDTA VS HIPOCLORITO
DE SODIO CON ÁCIDO ETIDRÓNICO, UTILIZADOS COMO IRRIGANTES
FRENTE A E. FAECALIS.**

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el Diploma de
Especialidad en endodoncia

Presenta:

C.D. Pamela Valdez Sánchez

Dirigido por:

C.D.E.E Daniel Alberto de la Rosa Moreno

Querétaro, Qro., a Abril de 2021



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina
Especialidad en Endodoncia

ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE: N-ACETILCISTEÍNA VS HIPOCLORITO DE SODIO Y EDTA VS HIPOCLORITO DE SODIO CON ÁCIDO ETIDRÓNICO, UTILIZADOS COMO IRRIGANTES FRENTE A E. FAECALIS.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de

Especialidad en Endodoncia

Presenta:

C.D. Pamela Valdez Sánchez

Dirigido por:

C.D.E.E Daniel Alberto de la Rosa Moreno

C.D.E.E Daniel Alberto de la Rosa Moreno

Presidente

C.D.E.E. Santiago Andaracua García

Secretario

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez

Vocal

C.D.E.E. Irak Villarreal Vera

Suplente

C.D.E.E. Miriam Mendoza Estrada

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Abril 2021

México

Resumen

Introducción: El objetivo del estudio fue determinar cuál irrigante elimina mayor cantidad de *E. faecalis*: Hipoclorito de Sodio 2.5% y EDTA 17%, hipoclorito de sodio 2.5% con ácido etidróico 9% o N-acetilcisteína 200 mg/ml.

Material y métodos: Estudio experimental *in vitro* no aleatorizado en el cual se estudiaron 60 premolares uniradiculares irrigados con: Hipoclorito de sodio 2.5% y EDTA 17%, Hipoclorito de sodio 2.5% con ácido etidróico 9%, Solución de N-acetilcisteína 200 mg/ml y NaCl 0.9%, para medir la cantidad de *E. faecalis* mediante un espectrofotómetro (absorbancia) y cultivo agar BHI (UFC). Los datos se evaluaron mediante la prueba kolmogórov-Smirnov y análisis de varianza de una vía (ANOVA), comparación múltiple de Post Hoc Tukey y prueba de Chi².

Resultados: La densidad óptica varió en proporción a la cantidad de bacterias ($p < 0.0001$). Hipoclorito de sodio 2.5% + EDTA obtuvo un promedio de $638,985 \pm 100,320$ UFC y una absorbancia proporcional de 1.166 ± 0.183 el cual, fue el promedio más bajo entre los irrigantes tomando en cuenta que el promedio del grupo que fue irrigado con solución salina 0.9% fue de $898,536 \pm 148,698$ UFC con absorbancia de 1.640 ± 0.272 y el grupo de N-acetilcisteína 200 mg/ml obtuvo $777,485 \pm 131,772$ UFC con absorbancia de 1.419 ± 0.241 y el grupo con etidronato obtuvo $780,260 \pm 140,462$ UFC con absorbancia de 1.424 ± 0.257 .

Conclusiones: La irrigación convencional utilizando hipoclorito de sodio 2.5% + EDTA 17% mostro superioridad como irrigante, al mostrar estadísticamente significancia (0.0001 p) en comparación con etidronato 9%, N-acetilcisteína 200 mg/ml y solución salina 0.9% al erradicar mayor cantidad de *E. Faecalis*. No existe diferencia estadísticamente significativa entre el etidronato 9%, N-acetilcisteína 200 mg/ml y solución salina 0.9% al ser utilizados como irrigantes contra *E. Faecalis*, sin embargo se observó una disminución en los niveles de absorbancia y UFC en N-acetilcisteína 200 mg/ml y etidronato 9% por lo tanto si tienen la capacidad de eliminar bacterias en comparación con solución salina 0.9%, además el Etidronato 9% tuvo mayor eficacia contra *E. Faecalis* que N-acetilcisteína 200 mg/ml pese a no ser estadísticamente significativo.

Palabras clave: Irrigante, N-acetilcisteína, Etidronato, NaOCl, *E. faecalis*.

Summary

Introduction: the objective of the study was to determine which irrigant eliminates the greatest amount of *E. faecalis*: Sodium hypochlorite 2.5% and EDTA 17%, sodium hypochlorite 2.5% with etidronic acid 9% or N-acetylcysteine 200 mg / ml.

Material and methods: Non-randomized in vitro experimental study in which 60 premolars (single root) were studied irrigated with: 2.5% sodium hypochlorite and 17% EDTA, 2.5% sodium hypochlorite with 9% etidronic acid, N-acetylcysteine solution 200 mg / ml and 0.9% NaCl, to measure the amount of *E. faecalis* by means of a spectrophotometer (absorbance) and BHI agar culture (UFC). The data were evaluated using the kolmogórov-Smirnov test and one-way analysis of variance (ANOVA), Post Hoc Tukey multiple comparison and Chi2 test.

Results: The optical density varied in proportion to the amount of bacteria ($p < 0.0001$). Sodium hypochlorite 2.5% + EDTA obtained an average of $638,985 \pm 100,320$ CFU and a proportional absorbance of $1,166 \pm 0.183$ which was the lowest average among the irrigants taking into account that the average of the group that was irrigated with 0.9% saline solution was $898,536 \pm 148,698$ CFU with absorbance of $1,640 \pm 0.272$ and the group of N-acetylcysteine 200 mg / ml obtained $777,485 \pm 131,772$ CFU with absorbance of $1,419 \pm 0.241$ and the group with etidronate obtained $780,260 \pm 140,462$ CFU with absorbance of $1,424 \pm 0.257$.

Conclusions: Conventional irrigation using 2.5% sodium hypochlorite + 17% EDTA showed superiority as an irrigant, showing statistically significant (0.0001 p) compared to etidronate 9%, N-acetylcysteine 200 mg / ml and saline 0.9% when eradicating greater amount of *E. faecalis*. There is no statistically significant difference between etidronate 9%, N-acetylcysteine 200 mg / ml and saline 0.9% when used as irrigants against *E. faecalis*, however a decrease in absorbance and CFU levels was observed in N-acetylcysteine 200 mg / ml and etidronate 9% therefore if they have the ability to eliminate bacteria compared to saline 0.9%, in addition Etidronate 9% had greater efficacy against *E. faecalis* than N-acetylcysteine 200 mg / ml despite not being statistically significant.

Keywords: Irrigant, N-acetylcysteine, Etidronate, NaOCl, *E. faecalis*.

Dedicatorias

A la memoria de mi padre Víctor Manuel Valdez Morales, por seguir pintando conmigo cada uno de mis días.

A mi madre María Esther Sánchez Rocha por su apoyo incondicional, su paciencia y su fe en mí.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Agradecimientos

A mis padres y mis tres hermanos por su apoyo, sus palabras de aliento, su amor y su gran paciencia.

A mis compañeras, por demostrarme que siempre hay cosas por aprender, por los momentos vividos durante el posgrado y por hacerme crecer como persona.

A mis profesores por su gran paciencia, por su disposición al enseñar y por ayudarme a formarme como especialista

A la Dra. Michelle Julissa Heredia Gutiérrez por su valiosa ayuda y por motivarme siempre a dar más.

Al Dr. Rubén Domínguez Pérez por apoyarme y guiarme durante la elaboración del proyecto pese a las dificultades y/o accidentes.

Al Dr. Daniel Alberto de la Rosa Moreno por darme la oportunidad de enfocar mi camino en dicha investigación.

Y a Dios por permitirme seguir aquí.

Índice

Contenido	Página
Resumen	I
Summary	II
Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Índice	V
Índice de cuadros	VI
Abreviaturas y siglas	VII
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
II.1 Hipoclorito de sodio + EDTA	3
II.2 Ácido etidróico	4
II.3 N-acetilcisteína	5
III. Fundamentación teórica	7
III.1 Infección del sistema de conductos	7
III.2 Características de <i>Enterococcus faecalis</i>	9
III.3 Importancia de la irrigación	10
III.4 Irrigantes utilizados comúnmente en endodoncia	12
III.4.1 Hipoclorito de sodio	12
III.4.2 Quelantes	13
III.5 Nuevos irrigantes	14
III.5.1 Ácido etidróico	14
III.5.2 N- acetilcisteína	17
IV. Hipótesis o supuestos	19
V. Objetivos	20
V.1 General	20
V.2 Específicos	20
VI. Material y métodos	22
VI.1 Tipo de investigación	22

	VI.2 Población o unidad de análisis	22
	VI.3 Muestra y tipo de muestra	22
	VI.3.1 Criterios de selección	22
	VI.3.2 Variables estudiadas	24
	VI. Técnicas e instrumentos	27
	VI. Procedimientos	28
	VI.5.1 Análisis estadístico	37
VII. Resultados		38
VIII. Discusión		41
IX. Conclusiones		46
X. Propuestas		47
XI. Bibliografía		48
XII. Anexos		59
X1.1 Hoja de recolección de datos		59

Índice de cuadros

Cuadro		Página
VII.1	Comparación de la absorbancia detectada en los cuatro grupos de estudio a una longitud de onda de 400 nm.	38
VII. 1.1	Comparación entre los diversos irrigantes utilizados respecto a niveles de absorbancia.	38
VII. 2	Comparación del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en los cuatro grupos de estudio.	39
VII. 2.1	Comparación entre los diversos irrigantes utilizados respecto a UFC.	39
VII. 3	Distribución de distintos intervalos según la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en los cuatro grupos de estudio.	40

Abreviaturas y siglas

NaOCl: hipoclorito de sodio.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

NAC: N-acetilcisteína.

HEBP: ácido etidróico / etidronato.

UFC: unidades formadoras de colonias.

NaCl: cloruro de sodio.

CHX: clorhexidina.

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*.

BHI: infusión cerebro corazón.

D.E.: desviación estándar.

X: promedio.

fi: frecuencia absoluta.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. Introducción

El objetivo del tratamiento de endodoncia es el desbridamiento completo y la limpieza del sistema del conducto radicular de cualquier tejido pulpar infectado para que el espacio del conducto pueda moldearse y prepararse para ser llenado con un material inerte, previniendo o minimizando cualquier posibilidad de reinfección (Siquiera et al., 2001).

Sin embargo, es difícil obtener un conducto radicular libre de bacterias debido a las complejidades anatómicas de los conductos radiculares, residuos orgánicos y bacterias inalcanzables ubicadas profundamente en los túbulos dentinarios (Mohammadi y Abbott, 2009), que pueden a su vez formar una biopelícula la cual es definida como una comunidad microbiana sésil, multicelular, caracterizada por células que están firmemente adheridas a una superficie y enredadas en una matriz autoproducida de una sustancia polimérica extracelular (EPS) (Haapasalo et al., 2007). Es por ello, que la terapia de conductos incluye el uso de instrumentos en combinación con soluciones de irrigación para eliminar dicha biopelícula de las paredes del conducto y el interior de los túbulos dentinarios. Si bien la instrumentación mecánica reduce el número de microorganismos (Morago et al., 2016), genera una capa de residuos inorgánicos en las paredes del conducto radicular conocido como capa de frotis o barrillo dentinario (Violich y Chandler, 2010), la cual actúa como una barrera física que disminuye la difusión de soluciones de irrigación y medicamentos del conducto radicular dentro de los túbulos dentinarios (Wang et al., 2013), además contribuye a que las bacterias queden atrapadas dentro de los túbulos dentinarios (Drake et al., 1994), escapando así de la acción de los productos químicos utilizados (Orstavik et al., 1990).

Es por esto que el protocolo recomendado para la irrigación incluye el uso de hipoclorito de sodio (NaOCl) durante la preparación mecánica para disolver la materia orgánica y matar microorganismos seguido de un agente quelante para eliminar los componentes inorgánicos de la capa de frotis, dejando así un sustrato

adecuado para una eficacia óptima del irrigante final (Baca et al., 2011), sin embargo, estos agentes quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico, no son compatibles con el hipoclorito en términos de mantener el cloro activo en solución (Zehnder et al., 2005), de hecho, estos productos químicos reducen inmediatamente el hipoclorito a cloruro y, por lo tanto, lo vuelven no reactivo, además debilitan la dentina y afectan su integridad mecánica (Saleh et al., 1999).

El único producto químico con capacidad descalcificante identificado hasta ahora como compatible con NaOCl, al menos a corto plazo, es el 1-hidroxi-etilideno-1, 1-bisfosfonato (HEBP), también llamado ácido etidróico (Girard et al., 2005) el cual no afecta la actividad de disolución y las propiedades antimicrobianas del NaOCl (Tartari et al., 2015). Aunado a esto, en el estudio realizado por Arias-Moliz et al. (2014) encontraron que la solución HEBP al 9% contaba con actividad antimicrobiana por sí misma.

La solución N-acetilcisteína (NAC) también puede considerarse como una potencial solución de irrigación alternativa en las infecciones del conducto radicular, es un agente mucolítico antioxidante que se considera un fármaco no antibiótico con propiedades antibacterianas que reduce la formación de biopelículas, inhibe el crecimiento y erradica la biopelícula de *E. faecalis* (Quahet al., 2012), además promueve la alteración de las biopelículas maduras (Olofsson et al., 2003), por lo que sería interesante probar la incorporación de NAC como una solución irrigante del conducto radicular para superar la deficiencia de la mayoría de los irrigantes del conducto radicular para matar los microorganismos del conducto radicular y compararla a su vez con los irrigantes tradicionales (NaOCl y EDTA) y no tradicionales como lo es el ácido etidróico, por lo cual el objetivo de la investigación es determinar cuál irrigante elimina mayor cantidad de *E. faecalis*, el hipoclorito de sodio y EDTA, el hipoclorito de sodio con ácido etidróico o la N-acetilcisteína .

II. Antecedentes

Las primeras investigaciones sobre desinfección en endodoncia se han centrado en la eliminación de microorganismos planctónicos. Con una mayor conciencia del papel de las biopelículas en las infecciones endodónticas, actualmente se busca la erradicación de dicha biopelícula ya que los microorganismos que sobreviven al desbridamiento quimiomecánico del sistema de conductos radiculares o que persisten dentro de los materiales de relleno restantes (gutapercha/sellador) pueden inducir el fracaso del tratamiento endodóntico en circunstancias favorables (Ricucci et al., 2009).

Rôças et al. (2004) mencionan que *E. faecalis* a menudo se asocia con fracasos del tratamiento endodóntico, por lo tanto, puede considerarse como un organismo adecuado para estudiar la efectividad *in vitro* de diferentes desinfectantes diseñados para el tratamiento endodóntico, de hecho, en el estudio creado por Sedgley et al. (2006) se informó que la frecuencia de *E. faecalis* en tales infecciones periradiculares persistentes oscila entre el 32% y el 77%. Dada la prevalencia de *E. faecalis* en las infecciones endodónticas persistentes, Quah et al. (2012) señalaron es esencial erradicar este grupo de bacterias para asegurar el éxito del tratamiento y el retratamiento endodóntico.

Por lo cual, como menciona Metzger et al. (2011) para aumentar la eficacia de la preparación mecánica y la eliminación de bacterias, la instrumentación deberá complementarse con soluciones de irrigación activas, tales como:

Hipoclorito de sodio + EDTA

Es el principal químico responsable del desbridamiento del conducto radicular, como menciona Bryce et al. (2009) esto se debe a su capacidad para disolver la materia orgánica y alterar el biofilm. Sin embargo, como menciona Hulsmann et al. (2000) en su investigación, el NaOCl tiene un efecto adverso

sobre los tejidos vitales, dado que es tóxico para los tejidos perirradiculares, además Hu et al. (2010) demostraron que si se utiliza a alta concentración aumenta la degradación del colágeno y reduce la resistencia a la flexión de la dentina. sumado a esto Zehnder et al. (2005) menciona que, al ser el hipoclorito tan reactivo, no se puede combinar fácilmente con otras sustancias químicas.

Pese a esto como menciona Baca et al (2011) en su estudio, el protocolo recomendado para la irrigación incluye el uso de hipoclorito de sodio (NaOCl) durante la preparación mecánica para disolver la materia orgánica y erradicar microorganismos seguido de un agente quelante fuerte para eliminar los componentes inorgánicos de la capa de frotis, dejando así un sustrato adecuado para una eficacia óptima del irrigante final. Estos agentes quelantes, como el EDTA, aplicados después del NaOCl eliminan por completo la capa de frotis, pero se sabe según algunas investigaciones tales como la de Saleh et al. (1999) debilitan la dentina y afectan su integridad mecánica.

Cabe destacar que Zehnder et al. (2005) informaron que ni los agentes quelantes fuertes como el EDTA ni los ácidos orgánicos como el ácido cítrico son compatibles con el hipoclorito en términos de mantener el cloro activo en solución, ya que como menciona Rossi-Fedele et al. (2012) el EDTA reduce al instante la cantidad de cloro cuando se mezcla con NaOCl, resultando en la pérdida de su actividad antimicrobiana; de modo que estas soluciones no deberían de ser combinadas.

Ácido etidróico

Girard et al. (2005) mencionan que el único químico con capacidad de descalcificación identificado hasta ahora como compatible con NaOCl, al menos a corto plazo, es 1-hidroxietilideno-1, 1-bisfosfonato (HEBP), también llamado ácido etidróico el cual es un agente quelante biocompatible débil efectivo en la eliminación de la capa de frotis con efectos erosivos menos dañinos sobre la

dentina del conducto radicular, en comparación con otros agentes quelantes fuertes como el EDTA y el ácido cítrico. Además, la investigación llevada a cabo por Bedir et al. (2017) se sumó a los estudios que afirman que el etidronato se puede mezclar con hipoclorito de sodio (NaOCl) sin interferir con su actividad antimicrobiana o de disolución.

Otro estudio elaborado por Tartari et al. (2014) concuerda con tales resultados ya que demostró que la capacidad de disolución tisular de NaOCl no disminuye cuando se mezcla con HEBP. En el mismo año Arias-Moliz et al. (2014) realizó una investigación donde encontró que el HEBP (ácido etidróico) no interfirió con la capacidad de NaOCl para matar *E. faecalis* cultivadas en biopelículas y dentro de los túbulos dentinarios. En consecuencia, la solución de NaOCl / HEBP podría usarse como un solo irrigante durante y después de la instrumentación. Cabe destacar que en ese estudio también se observó actividad antimicrobiana de la solución HEBP al 9% por sí misma, por lo que se podría investigar aún más sobre su efecto como irrigante único.

N- acetilcisteína

Otra opción como irrigante es la N-acetilcisteína la cual según, Bulger y Maier (2001) es un agente atractivo para los ensayos clínicos, ya que se ha utilizado de forma segura en humanos durante varios años como agente mucolítico para el tratamiento de la sobredosis de acetaminofén y de la enfermedad pulmonar obstructiva. Lappas et al. (2003) exponen que la N-acetilcisteína (NAC) ejerce actividad antiinflamatoria a través de su capacidad para inhibir la expresión y liberación de una variedad de citocinas proinflamatorias.

Posteriormente Marchese A et al. (2003); Olofsson AC. (2003) revelaron que NAC es capaz de matar las formas planctónicas y biofilm de *E. faecalis* y *S. mutans* de manera efectiva.

Más tarde Quah et al. (2012) examinaron la NAC como medicación intraconducto y descubrió que NAC es más eficaz para matar *E. faecalis* en biopelículas a concentraciones de 50 mg / ml y un pH de 11 que el hidróxido de calcio durante un período de 7 a 21 días, además demostró que los efectos antibacterianos de NAC sobre *E. faecalis* no se vieron afectados por la presencia de polvo de dentina.

Posteriormente Darrag et al. (2013) observaron que la solución de 200 mg/ml de NAC podría considerarse como una posible solución alternativa de riego en las infecciones del conducto radicular debido a su eficacia antimicrobiana contra las bacterias planctónicas de *S. mutans* y *E. faecalis* en comparación con los agentes irrigadores de uso común, hipoclorito de sodio o clorhexidina.

Años más tarde Moon et al. (2016) comprobaron que NAC tiene efectos antibacterianos contra los patógenos endodónticos planctónicos, inhibe eficazmente su formación de biopelículas y erradica las biopelículas maduras de múltiples especies que consisten en patógenos endodónticos. En el 2018 Choi et al. mostraron en su investigación que NAC tiene un efecto bactericida estadísticamente mayor que el de la clorhexidina, eliminando biopelículas endodónticas de múltiples especies maduras como: *A. naeslundii*, *L. salivarius*, *S. mutans* y *E. faecalis*.

Todos estos estudios demuestran que NAC tiene el potencial de ser desarrollado como irrigante alternativo, por lo tanto, sería interesante corroborar su eficacia como irrigante, así como compararlo con nuevas sustancias como lo es el etidronato y el irrigante convencional (hipoclorito de sodio y EDTA), observando así cual de todas las soluciones nos brinda un conducto libre de tejido orgánico e inorgánico y a su vez de bacterias, logrando aumentar las probabilidades de éxito de nuestros tratamientos.

III. Fundamentación teórica

III.1 Infección del sistema de conductos radicular

Ha sido reconocido ampliamente que los microorganismos juegan un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de las patologías pulpares y periapicales (Takehashi et al., 1965).

Se ha detectado la presencia de hongos y, más recientemente, arqueas y virus en las infecciones endodónticas, pero las bacterias constituyen los principales microorganismos implicados en la patogenia de la periodontitis apical (Siqueira et al., 2011). Dichas bacterias están presentes en el conducto radicular como células individuales planctónicas flotantes o unidas entre sí o a las paredes del conducto radicular para formar una biopelícula (Ricucci y Siqueira, 2010), la cual, es definida como una comunidad estructurada protegida de células bacterianas incrustadas en una matriz polimérica autoproducida adherida entre sí y / o a superficies o interfaces (Jiang et al., 2011).

El primer paso en la formación de biopelículas es la adhesión a la superficie (Shen et al., 2011). Los mecanismos por los cuales las bacterias orales se adhieren a las superficies sólidas están influenciados por las propiedades de la superficie dura externa (Kolenbrander et al., 2002), por lo que actualmente se utilizan bloques de dentina radicular para tratar de simular las condiciones clínicas donde estudios previos han demostrado que la dentina tiene un efecto inhibitorio sobre la eficacia antibacteriana de los agentes desinfectantes (George et al., 2005). Se ha sugerido que la adhesión bacteriana se produce en 2 fases principales. La fase 1 es un proceso fisicoquímico que se produce en cuestión de segundos a minutos, mientras que la fase 2 se considera un proceso biológico celular-molecular de maduración de biopelículas, que se produce en un período de tiempo de unas pocas horas a dos días (Kishen et al., 2008).

La dificultad en la erradicación de las biopelículas bacterianas radica en el hecho de que el estilo de vida de la comunidad de biopelículas permite a los microorganismos muchas ventajas que no se observan para las células planctónicas, incluido el establecimiento de un rango de hábitat más amplio para el crecimiento, una mayor diversidad y eficiencia metabólicas, protección contra microorganismos competidores, defensas del huésped, agentes antimicrobianos, estrés ambiental y mayor patogenicidad. De hecho, la protección la proporcionan los cambios fisiológicos iniciados por las bacterias después de su adhesión a la superficie (Fletcher et al., 1991), cabe destacar que la adhesión se ve influenciada por las propiedades de la superficie (Kolenbrander et al., 2002), por lo que actualmente se utilizan bloques de dentina radicular para tratar de simular las condiciones clínicas donde estudios previos han demostrado que la dentina tiene un efecto inhibitorio sobre la eficacia antibacteriana de los agentes desinfectantes (George S. et al., 2005).

Y si bien la microbiota de los conductos radiculares necróticos es típicamente polimicrobiana con proporciones aproximadamente iguales de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, está dominada por bacterias anaerobias (Hancock et al., 2001). Sin embargo, las bacterias que podemos encontrar en las infecciones primarias pertenecen a diversos géneros de bacterias gramnegativas (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* y *Veillonella*) y grampositivas (*Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, en cambio, la flora microbiana de los conductos radiculares tratados con lesiones apicales persistentes se ha descrito como una monoinfección de microorganismos predominantemente grampositivos con una proporción aproximadamente igual de anaerobios facultativos y obligados (Sundqvist et al., 1998). Las bacterias grampositivas facultativas o anaerobias que podemos detectar a menudo en esas muestras son *Streptococcus*, *P. micra*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *P. alactolyticus*, *Lactobacillus*, *E. faecalis* y *Olsenella ulic*, lo que apoya la teoría de que las bacterias grampositivas pueden ser más resistentes al tratamiento

antimicrobiano y que podrían tener la capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales más adversas en los conductos radiculares instrumentalizados y medicados.

Y pese a que puede ser imposible erradicar todas las bacterias en el sistema del conducto radicular, un objetivo terapéutico más realista podría ser reducir el recuento de bacterias a un nivel por debajo del necesario para mantener la enfermedad (Siqueira et al., 2008).

Si bien se mencionó anteriormente las infecciones endodónticas son polimicrobianas, se seleccionó un cultivo de una sola especie de *E. faecalis* por las siguientes razones: se encuentra comúnmente en las infecciones del conducto radicular ya sea primaria o secundaria (Rôças et al., 2004) y se utiliza ampliamente en la prueba de la eficacia de los agentes desinfectantes en endodoncia.

III. 2 Características de *Enterococcus faecalis*.

Son cocos grampositivos, no formadores de esporas, que se presentan individualmente, en pares y en cadenas cortas, además es un anaerobio facultativo el cual es capaz de sobrevivir en ambientes hostiles (Kishen et al., 2004), de hecho, cuenta con la capacidad de formar biopelículas lo cual a su vez podría ser un factor que contribuya a los fracasos del tratamiento endodóntico.

E. faecalis es una bacteria resistente a la terapia en los conductos radiculares, ya sea en infecciones endodónticas primarias o secundarias (Own et al., 2013) y aunque los estudios moleculares han demostrado que no es una especie predominante en casos de retratamiento endodóntico (Rocas et al., 2004; Sakamoto et al., 2008), ha sido confirmado como el microorganismo más comúnmente encontrado en infecciones persistentes / secundarias (Rocas et al., 2004; Siqueira y Rocas, 2004). Sin embargo, *E. faecalis* también se ha identificado en casos sin lesiones de periodontitis apical (Molander et al.,

1998), por lo tanto, puede no ser necesariamente el principal patógeno asociado con la enfermedad postratamiento (Kaufman et al., 2005; Zoletti et al., 2006).

Los factores de virulencia de *E. faecalis* incluyen: citolisina y enzimas proteolíticas (serina proteasa y gelatinasa la cual es una metaloproteasa hidrófoba con la capacidad de escindir insulina, caseína, hemoglobina, colágeno y fibrina (Waters et al., 2003)), sin embargo, el microorganismo puede no expresar gelatinasa (Roberts et al., 2004).), también cuenta con adhesinas (sustancia de agregación, proteína de superficie de enterococos (Esp), proteína de adhesión de colágeno la cual es probable que medie la interacción primaria del patógeno con las superficies del hospedador durante la formación de la biopelícula (Tendolkar et al., 2004)) y polisacáridos capsulares y de la pared celular (Jett et al., 1994). Estos factores de virulencia, en concentraciones suficientes, pueden permitir que el microorganismo permanezca en el conducto radicular e infligir directa o indirectamente daño a los tejidos perirradiculares (Love, 2001; Sedgley et al., 2005).

Por lo tanto, puede considerarse como un organismo adecuado para estudiar la efectividad *in vitro* de diferentes aplicaciones de desinfección diseñadas para el tratamiento de endodoncia (Rôças, 2004; Du, 2013).

III. 3 Importancia de la irrigación

Si bien la preparación biomecánica es uno de los aspectos más importantes del tratamiento endodóntico el cual implica la eliminación de los desechos orgánicos e inorgánicos infectados y la conformación del sistema de conducto radicular para recibir un material de relleno (Raghavendra et al., 2018), es difícil obtener un sistema de conducto radicular libre de bacterias debido a las complejidades anatómicas de los conductos radiculares (Mohammadi y Abbott, 2009) aunado a esto cada vez que se realiza la instrumentación, la dentina es cortada en pequeñas partículas de matriz de colágeno mineralizado. Esto se extiende sobre la superficie del sistema del

conducto radicular y se llama capa de frotis (barrillo dentinario) el cual contiene desechos inorgánicos, material orgánico como: tejido pulpar, desechos necróticos, proteínas coaguladas, células sanguíneas, fibras nerviosas, colágeno, líquido tisular, microorganismos y sus subproductos (Violich y Chandler, 2010). La capa de frotis actúa como una barrera física que disminuye la difusión de soluciones de irrigación y medicamentos del conducto radicular dentro de los túbulos dentinarios (Wang et al., 2013), además contribuye a la microfiltración ya que proporciona refugio y nutrición a microorganismos, sumado a esto actúa como una barrera entre las paredes del conducto y el material de relleno, oblitera los túbulos dentinarios (Akhlaghi et al., 2014).

Por lo tanto, las características ideales que debe cumplir un irrigante son (Zehnder et al., 2006):

- ❖ Que tengan un amplio espectro y alta eficiencia contra microorganismos anaerobios y facultativos.
- ❖ Disolver los tejidos orgánicos, ya sea pulpa vital o necróticos remanentes.
- ❖ Inactivar las endotoxinas.
- ❖ Prevenir la formación de barrillo dentinario durante la instrumentación o disolverlo una vez de formado.
- ❖ Baja tensión superficial.
- ❖ Escasa toxicidad para los tejidos perirradiculares vitales.
- ❖ Lubricar las paredes del conducto.

Por lo que con la irrigación se pretende eliminar la capa residual, compuesta por restos orgánicos e inorgánicos, incluyendo microorganismos que podrían permanecer viables en su interior y ser la causa de reagudizaciones (McComb y Smith, 1975).

III. 4 Irrigantes utilizados comúnmente en endodoncia

III. 4.1 Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio ha sido definido por la Asociación Americana de Endodoncia (2015) como un líquido claro, pálido, verde-amarillento, extremadamente alcalino, que presenta una acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos, además de ser un potente agente antimicrobiano. Es efectivo principalmente contra las bacterias Gram - y Gram +, así como las levaduras, en sus diferentes concentraciones, las cuales van del 0,5% (solución de Dakin), 1% (solución de Milton) al 2,5% (solución de Labarraque) y últimamente los nuevos protocolos lo utilizan al 6%.

La solución de irrigación NaOCl se usa comúnmente para disolver el tejido necrótico y eliminar las biopelículas situadas en el espacio del conducto radicular, sin embargo, debido a que los efectos tóxicos del NaOCl aumentan a concentraciones más altas (Hauman et al., 2003) mientras que los efectos antibacterianos dentro del conducto siguen siendo los mismos, decidimos utilizar NaOCl al 2.5% en la investigación.

La eficacia química depende de su forma de cloro libre, que está influenciada por factores como: su concentración, tiempo de exposición, pH, temperatura e interacción con otras sustancias orgánicas o inorgánicas presentes en el espacio del conducto radicular (Baker, 1947; Macedo, 2010).

De hecho es importante destacar que el hipoclorito si reacciona con los residuos orgánicos contenidos en el conducto radicular y de esta forma facilita su limpieza, pero esta reacción inactiva químicamente a la solución reduciendo su capacidad antibacteriana (agotamiento del cloro libre disponible (ácido hipocloroso y el ion hipoclorito)), por ello debe ser aplicado frecuentemente dentro del conducto radicular para reactivar la reacción química y la remoción de los restos pulpares (Beatriz, 2018). Sin embargo, estudios han demostrado que el uso de altas concentraciones de hipoclorito de sodio aumenta la

degradación del colágeno, la desprotección de la dentina y reduce la resistencia a la flexión de la dentina (Zhang et al., 2010). Otra desventaja a considerar del NaOCl es su incapacidad para eliminar los componentes inorgánicos como el barrillo dentinario, por lo tanto, su asociación con agentes quelantes que actúan sobre la materia inorgánica es necesaria para la eliminación completa de la capa de frotis (Scelza, 2003; Yadav, 2015).

III. 4.2 Quelantes

Los agentes quelantes se introdujeron en endodoncia como ayuda para la preparación de conductos radiculares estrechos y calcificados en 1957 por Nygaard-Østby. El término "quelato" se origina de la palabra griega "Chele" (garra de cangrejo). Los quelantes son complejos estables formados como resultado del enlace entre los iones metálicos y el quelante (ligando) que tiene más de un par de electrones libres. Inducen cambios en la concentración de iones de calcio y fósforo en la dentina del conducto radicular (Rotstein et al., 1996). El efecto desmineralizador de los quelantes actúa simultáneamente sobre la capa de frotis y la dentina del conducto radicular, lo que resulta en la exposición al colágeno y la reducción de la micro dureza de la dentina sin embargo la eliminación de la capa de frotis aumenta la penetración de los irrigantes en los túbulos dentinarios para permitir una desinfección adecuada (Heckendorff, 2003) pero la desmineralización continúa hasta que todos los quelantes hayan formado complejos con calcio.

En la actualidad, los agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido cítrico son probablemente los productos químicos más utilizados para ese propósito (González-López et al., 2006) sin embargo, Seidberg y Schilder (1974) mostraron que las propiedades de los quelantes (EDTA) fueron autolimitadas, debido a los cambios de pH durante la desmineralización de la dentina. En condiciones normales, la mayoría de los quelantes tienen un pH casi neutro pero debido a la liberación del ácido por intercambio de calcio de la dentina con hidrógeno, la eficiencia

del EDTA disminuye con el tiempo. Aunado a esto cuando se usa como irrigante final, deja la matriz de colágeno en la superficie del conducto radicular y contribuye a la adherencia bacteriana y la recontaminación (Humble et al., 2003), por lo tanto, NaOCl debe usarse como un irrigante final después del agente quelante para eliminar la matriz de colágeno en un proceso llamado desproteinización (Bedir, 2017; Niu, 2002), pero es importante mencionar que el EDTA y el ácido cítrico interfieren con las propiedades de disolución del tejido orgánico y la eficacia antimicrobiana del hipoclorito de sodio (Zehnder et al., 2005) al reducir el cloro libre disponible (De-Deus et al., 2006) por lo que no se pueden utilizar a la vez. Por lo que según Lottanti et al. (2009) se tienen dos opciones: usar un quelante que no interfiera con el hipoclorito de sodio o usar un quelante con una fuerte capacidad desinfectante como irrigante final.

III. 5 Nuevos irrigantes

III. 5.1 Ácido etidróico

El etidronato pertenece a la familia de los bisfosfonatos, contiene dos grupos fosfonato (PO_3), los cuales se unen a un carbono central que reemplaza el oxígeno en pirofosfato. Esta estructura tridimensional del pirofosfato puede quelar los cationes divalentes (Ca^{2+}). Por lo tanto, tiene una fuerte afinidad ósea remodeladora (Bedir et al., 2017).

Los bisfosfonatos realizan la modulación ósea en tres niveles (Bedir et al., 2017):

A) A nivel de tejido: disminuye la resorción ósea y el número de nuevas células óseas que conduce a una disminución del recambio óseo. Por lo tanto, se mantiene el equilibrio óseo positivo en el cuerpo.

B) A nivel celular: disminución del reclutamiento de osteoclastos, aumento de la apoptosis de los osteoclastos, disminución de la adhesión de los

osteoclastos, disminución de la liberación de citocinas por los macrófagos y aumento de los osteoblastos.

C) A nivel molecular: inhibe la vía del mevalonato, que es una vía metabólica celular importante presente en todos los eucariotas superiores y en muchas bacterias.

Además, el ácido etidronico no es tóxico y se ha aplicado sistemáticamente en pacientes que padecen resorción ósea osteoclástica, enfermedades neoplásicas, osteoporosis, enfermedad de Paget, mieloma múltiple y cáncer de mama / próstata (Russell y Rogers, 1999) y al igual que el EDTA, es un quelante comúnmente utilizado como complemento en productos para el hogar y el cuidado personal, como los jabones (Coons et al., 1987), en la pasta de dientes para controlar la formación de cálculos y eliminarlos (Goodman et al., 2006).

Recientemente, su uso como agente quelante durante el tratamiento del conducto radicular se ha incrementado excesivamente en lugar de EDTA (Bedir et al., 2017). Debido a que la combinación de NaOCl y etidronato elimina la capa de frotis de manera similar al EDTA y reduce la acumulación de restos de tejido duro (Paqué et al., 2012) mientras mantiene la actividad de disolución y las propiedades antimicrobianas del NaOCl (Tartari et al., 2015), de hecho esto fue probado en el estudio de Arias-Maliz et al. (2014) donde las propiedades de dichos irrigantes no se vio afectada por el polvo de dentina después de un tiempo de contacto de 3 minutos contra la biopelícula de *E. faecalis*. sumado a esto se encontró que el HEBP al 9% por sí mismo reducía significativamente el biovolumen total de las biopelículas de *E. faecalis*. Los valores medios del porcentaje de células muertas mediante el método confocal fueron los siguientes: control: 1,79%, NaOCl: 86,77%, NaOCl / HEBP: 92,57% y HEBP: 88,73%. No se encontraron diferencias estadísticas en la cantidad de células muertas entre la HEBP aislada y cualquiera de las soluciones de NaOCl, esto se atribuye a que la solución presenta un pH de 11,69, por encima

del límite de tolerancia al pH de *E. faecalis*. Por otro lado, no se observó el mismo efecto cuando esta solución estuvo en contacto directo con el biofilm de *E. faecalis*. Este resultado puede atribuirse a la diferente densidad de células que se encuentran en los túbulos dentinarios y en la superficie del dispositivo donde se realizó el estudio, dado que una mayor biomasa probablemente presenta una mayor resistencia al estrés alcalino y la capacidad de neutralizar el pH alcalino en comparación con las bacterias del interior de los túbulos dentinarios. Por lo que esto abre la posibilidad de utilizar el etidronato como irrigante único y ver su eficacia en diferentes concentraciones contra diversos patógenos.

Asimismo, la combinación de ambos irrigantes presenta diversas ventajas tales como: que un protocolo de irrigación quelante suave optimiza la calidad de la unión de los selladores debido a la mejor apertura de los túbulos de dentina que estaban cubiertos con la capa de frotis (De-Deus et al., 2008). Otro beneficio que fue explicado en el artículo de Tartari et al. (2013) es que al ser un quelante débil causa un menor daño en la dentina que otros agentes quelantes.

Otro aspecto beneficioso de la irrigación continua con la solución de NaOCl al 2.5% / HEBP al 9% en lugar del uso de NaOCl durante la instrumentación del conducto radicular seguida de un agente quelante fuerte que se genera una menor cantidad de barrillo dentinario. Esto ayuda a reducir la reactividad del NaOCl con el residuo, lo que significa un menor consumo del cloro libre disponible y, en consecuencia, una mayor estabilidad de la solución combinada (Morago et al. 2016). Es importante mencionar que Yadav et al. (2015) informaron que la capacidad de quelación es similar con un 18% de HEBP y un 17% de EDTA, por lo que recomiendan el uso de un 7-10% de HEBP como un agente de complejo de calcio menos agresivo para prevenir cambios dentinarios erosivos, es por ello que durante la investigación se utilizó ácido etidróico a una concentración de 9%. Y gracias a que HEBP es un

quelante relativamente débil, la creación de errores de preparación puede ser menor que con EDTA.

Por lo tanto, los protocolos de riego que emplean ácido etidróico tienen el potencial de reemplazar el tratamiento convencional con EDTA (Darrag et al., 2013), sin embargo, no se ha comparado hasta el momento el uso de etidronato y su capacidad para eliminar bacterias con otra solución alternativa llamada N-acetilcisteína.

III. 5.2 N- acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC), es un derivado del aminoácido L-cisteína, un potente agente antioxidante y mucolítico que contiene tior que interrumpe los enlaces disulfuro en el moco y reduce la viscosidad de las secreciones (El-Feky et al., 2009; Zhao y Liu, 2010). NAC es un agente atractivo para los ensayos clínicos, ya que se ha utilizado de forma segura en humanos durante varios años como agente mucolítico para el tratamiento de la sobredosis de acetaminofén y de la enfermedad pulmonar obstructiva (Bulger y Maier, 2001).

Además, se ha informado que NAC exhibe actividad antibacteriana contra una variedad de bacterias importantes desde el punto de vista médico como *Staphylococcus epidermidis*, (Hurtado y Blanco, 1997) *Escherichia coli*, (Marchese et al., 2003) *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao y Liu, 2010) y *Klebsiella pneumoniae*, (Olofsson et al., 2003) y patógenos orales como *Prevotella intermedia* (Moon et al., 2015) y *E. faecalis*, (Quah et al., 2012) que a menudo se encuentran en infecciones endodónticas. Estas características indican la posibilidad de usar NAC para enfermedades dentales (Choi et al., 2018).

El mecanismo de los efectos antibacterianos de NAC probablemente se deba a la reacción de su grupo -SH con los enlaces disulfuro de las proteínas bacterianas, lo que lleva al daño irreversible de las proteínas bacterianas que son esenciales para el crecimiento y el metabolismo

bacteriano (Sevier y Kaiser, 2002; Quah, 2012). La acción de interrupción de la biopelícula de NAC probablemente se deba a su efecto sobre la producción de exopolisacáridos (EPS) al romper los enlaces disulfuro de las enzimas bacterianas involucradas en la producción o excreción de EPS a través del intercambio tiol-disulfuro (Olofsson et al., 2003).

También se planteó la hipótesis de que NAC es un antioxidante que puede tener efectos indirectos sobre el metabolismo celular bacteriano y la producción de exo-polisacáridos (Quah et al., 2012) que puede reducir la viabilidad celular. Esta reducción de los exopolisacáridos bacterianos, que son el componente principal de la biopelícula, afectará la captura y concentración de minerales y nutrientes esenciales del entorno circundante, promoviendo así la interrupción de las películas maduras e inhibiendo la adhesión y viabilidad bacteriana (Zhao y Liu, 2010).

Más adelante Cindy et al. (2013) descubrió que, en el caso de la solución NAC, el efecto más importante se observó a 200 mg / ml como agentes antimicrobianos contra las bacterias orales, por lo que se eligió esta concentración.

Aunque la NAC muestra una buena eficacia antimicrobiana y tiene potencial como método de irrigación, los efectos a corto y largo plazo de la NAC en la dentina se desconocen actualmente y quedan por probar, además claro está de comparar con los métodos tradicionales de irrigación con NaOCl + EDTA y con sustancias alternativas como lo es el etidronato.

IV. Hipótesis

Hipótesis de trabajo

La N-acetilcisteína 200mg/ml utilizada como irrigante elimina mayor cantidad de *E. faecalis* que el hipoclorito de sodio al 2.5% y EDTA al 17% y que el hipoclorito de sodio al 2.5% con ácido etidróico al 9%

Hipótesis nula

La N-acetilcisteína 200 mg/ml utilizada como irrigante elimina menor cantidad de *E. faecalis* que el hipoclorito de sodio al 2.5% y EDTA al 17% y que el hipoclorito de sodio al 2.5% con ácido etidróico al 9%.

Hipótesis alterna

La N-acetilcisteína 200 mg/ml utilizada como irrigante elimina la misma cantidad de *E. faecalis* que el hipoclorito de sodio al 2.5% y EDTA al 17% y que el hipoclorito de sodio al 2.5% con ácido etidróico al 9%.

V. Objetivos

V.1 Objetivo general

Determinar cuál irrigante elimina mayor cantidad de *E. faecalis*, el Hipoclorito de Sodio y EDTA, el Hipoclorito de Sodio con Ácido Etidrónico o la N-acetilcisteína

V.2 Objetivos específicos

- ❖ Cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) después de utilizar como irrigante hipoclorito de sodio al 2.5% con ácido etidrónico al 9% (Debido a sucesos inesperados durante el experimento, lo cual se explica en metodología, se optó por utilizar como irrigante único el ácido etidrónico al 9%).
- ❖ Cuantificar las unidades formadoras de colonias después de utilizar como irrigante hipoclorito de sodio al 2.5% seguido de EDTA al 17%.
- ❖ Cuantificar las unidades formadoras de colonias después de utilizar como irrigante la N-acetilcisteína 200mg/ml.
- ❖ Comparar los resultados obtenidos: hipoclorito de sodio al 2.5% y EDTA al 17%, hipoclorito de sodio al 2.5% con ácido etidrónico 9% y la N-acetilcisteína 200mg/ml en la eliminación de *E. faecalis*.
- ❖ Evaluar el nivel de absorbancia obtenido en las muestras después de utilizar como irrigante hipoclorito de sodio al 2.5% con ácido etidrónico al 9% (Debido a sucesos inesperados durante el experimento, lo cual se explica en metodología, se optó por utilizar como irrigante único el ácido etidrónico al 9%).

- ❖ Evaluar el nivel de absorbancia obtenido en las muestras después de utilizar como irrigante hipoclorito de sodio al 2.5% seguido de EDTA al 17%.
- ❖ Evaluar el nivel de absorbancia obtenido en las muestras después de utilizar como irrigante la N-acetilcisteína 200mg/ml.
- ❖ Comparar los resultados obtenidos: hipoclorito de sodio al 2.5% y EDTA al 17%, hipoclorito de sodio al 2.5% con ácido etidróico 9% y la N-acetilcisteína 200mg/ml en los niveles de absorbancia.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VI. Material y Métodos

VI.1 Tipo de investigación: Experimental *in vitro*.

VI.2 Unidad de análisis: primeros y segundos premolares superiores e inferiores extraídos que cumplieron los criterios de inclusión, se cortaron a una longitud de 12mm, se les realizó un acceso, se instrumentaron hasta una lima manual tipo k #20 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza), se esterilizaron para posteriormente ser inoculados con *E. faecalis*.

VI.3 Muestra y tipo de muestra: 60 premolares que cumplieron con los criterios de inclusión, los cuales fueron divididos en 4 grupos dependiendo el tipo de irrigante que se utilizó para erradicar *E. faecalis*: N-acetilcisteína 200mg/ml, hipoclorito de sodio 2.5% con ácido etidróico 9% (Debido a sucesos inesperados durante el experimento lo cual se explica en metodología, se optó por utilizar como irrigante único el ácido etidróico al 9%), hipoclorito de sodio 2.5 % y EDTA 17% y por último solución salina 0.9%.

3.5 Definición del grupo control

15 órganos dentales fueron irrigados con solución salina.

VI.3.1 Criterios de selección:

Criterios de inclusión

Órganos dentales humanos extraídos con las siguientes características:

- ❖ Extraídos por ortodoncia
- ❖ Unirradiculares (premolares).
- ❖ Raíces con morfología recta.
- ❖ Ápices cerrados.
- ❖ Conductos únicos.
- ❖ Ausencia de caries.

3.7 Criterios de exclusión:

- ❖ Órganos dentales con reabsorción interna o externa.
- ❖ Órganos dentales con restauraciones.
- ❖ Órganos dentales previamente tratados.
- ❖ Órganos dentales con calcificaciones.
- ❖ Órganos dentales fracturados y/o fisurados.
- ❖ Órganos dentales con malformaciones radiculares.

3.8 Criterios de eliminación

- ❖ Órganos dentales que se hayan fracturado o perforado durante el procedimiento.
- ❖ Órganos dentales que contengan fragmento de instrumento rotatorio fracturado dentro del conducto radicular.

VI.3.2 Variables estudiadas:

Variable dependiente	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Unidades formadoras de colonias de <i>E. faecalis</i>. (UFC)	Término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.	La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra	Cuantitativa	Continua	UFC/ml
Absorbancia	Indica la cantidad de luz absorbida por la muestra	La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración –a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas-; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución, a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará.	Cuantitativa	Continua	nm

Variable independiente	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Solución de N-acetilcisteína 200 mg/ml	NAC es un derivado del aminoácido L-cisteína, que es un agente antioxidante mucolítico que se considera un fármaco no antibiótico con propiedades antibacterianas que disminuye la formación de biopelículas.	La solución de NAC a una concentración de 200 mg, se irriego a un volumen de 5 ml de la solución en cada muestra y se dejó en el conducto durante 5 minutos.	Cuantitativa	Continua	Mililitros
Solución de Hipoclorito de sodio al 2.5% con ácido etidrónico al 9%	El hipoclorito de sodio es un irrigante halogeno. El etidronato, también conocido como bisfosfonato, ácido etidrónico o HEBP (1-hidroxietilideno-1, 1-bisfosfonato) tienen la capacidad de eliminar la fase inorgánica de la capa de frotis. La mezcla de NaOCl y HEBP tiene la capacidad de reducir la formación de capas de frotis durante la instrumentación del conducto. Además, la HEBP no afecta la actividad de disolución y las propiedades antimicrobianas de NaOCl	Ambos irrigantes se mezclaron en una proporción 1:1. Diez mililitros de la solución irrigante sería utilizada durante la irrigación del conducto radicular por 3 minutos. Pero al realizar la combinación de las soluciones hubo una interacción entre las sustancias con liberación de gas por lo que se optó por irrigar con 10ml de etidronato al 9% por 3 minutos.	Cuantitativa	Continua	Mililitros
Solución de Hipoclorito de sodio al 2.5% y EDTA al 17%	El hipoclorito de sodio es un irrigante halogeno. El ácido etilendiaminotetraacético es un fuerte agente quelante	Se aplicaron secuencialmente 6 ml de NaOCl 2.5%, 3ml de EDTA al 17 % y 6 ml de NaOCl	Cuantitativa	Continua	Mililitros

	<p>La solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) como solución de irrigación, tiene una actividad microbicida y una capacidad de disolución del tejido. El EDTA ayuda a la eliminación de la capa de barrillo dentinario y aumenta la penetración de los irrigantes en los túbulos dentinarios para permitir una desinfección adecuada</p>	<p>2.5% con aguja Endo-Eze® 30seg con cada solución. Se realizará el movimiento de entrada y salida del conducto durante la administración de la solución sin llegar a retirar la aguja en su totalidad.</p>			
<p>Solución salina al 0.9%</p>	<p>Solución de cloruro sódico en agua purificada.</p>	<p>Quince mililitros de la solución será utilizada durante la irrigación del conducto radicular por 3 minutos.</p>	<p>Cuantitativa</p>	<p>Continua</p>	<p>Mililitros</p>

VI.4 Técnicas e instrumentos

Durante la investigación se utilizó un espectrofotómetro (SP-V1100, DLAB Scientific CO, China) para medir la absorbancia de cada una de las muestras a diferentes densidades ópticas, utilizando el principio de espectroscopía óptica según la ley de Beer Lambert, el cual dice que cuando una luz de longitud de onda específica atraviesa una muestra, la fracción de radiación absorbida por la muestra será en función de la concentración de sustancia en la trayectoria de la luz. Sumado a esto se optó por hacer la relación entre los niveles de absorbancia de las muestras y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) al hacer el recuento de UFC en cajas de Petri con agar BHI, lo cual se explica con mayor detalle en procedimientos.

Los resultados de cada una de las muestras fueron registrados en el programa de Microsoft para Windows Excel y a partir de esto se realizó un análisis estadístico por medio de GraphPad Software Inc, los resultados se representaron por medio de tablas en el capítulo de resultados.

VI.5 Procedimiento

Para este estudio experimental *in vitro* además de la cepa bacteriana de *E. faecalis* se recolectaron 60 órganos dentales humanos extraídos por indicación ortodóncica, los cuales se obtuvieron por medio de la donación de los pacientes después de la extracción de los órganos dentales, los cuales contaron con las siguientes características; unirradiculares (premolares), raíces con morfología recta, ápices cerrados, conductos únicos y ausencia de caries. Dichas piezas fueron utilizadas durante el experimento *in vitro* con el fin de realizar la investigación.

Preparación de especímenes dentales experimentales:

1. Dado que algunos de los especímenes seleccionados presentaron cálculo, placa dentobacteriana y/o algún cuerpo extraño adherido a la superficie radicular fue necesaria su remoción.
2. Posterior a la limpieza de cada órgano dental se almacenaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.01% hasta su preparación.
3. Cada órgano dentario se recortó en sentido transversal con un disco de diamante montado en una pieza de baja velocidad, con el objetivo de dejar un remanente radicular de 12 mm (midiéndolo desde el ápice hasta tercio medio de la raíz).
4. Antes de la determinación de la longitud de trabajo, las superficies de los dientes experimentales se desinfectaron mediante inmersión en NaOCl al 5,25% durante 1 minuto seguido de un lavado con agua destilada durante 10 minutos.
5. Por medio de limas manuales tipo k #10, #15 y #20 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza) se patentizó el conducto radicular, se eliminó tejido y se tomó la longitud de trabajo real de cada espécimen (a 0.5 mm del ápice radiográfico), además se estandarizó la entrada del conducto de todas las piezas utilizando fresas peso # 3 (Dentsply Maillefer, Suiza) (Figura 1).

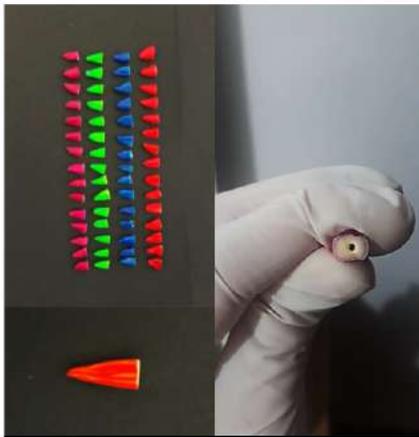


Figura 1: a) 60 Muestras recolectadas, b) Raíz de 12 mm, c) Acceso estandarizado después de utilizar fresa Peeso #3.

6. Durante la preparación quimiomecánica del conducto radicular, a cada lima le siguió una irrigación con 1 ml de NaOCl al 2.5% (debido a que los efectos tóxicos del NaOCl aumentan a concentraciones más altas mientras que los efectos antibacterianos dentro del canal siguen siendo los mismos, por ello se utilizó NaOCl al 2.5%). Al terminar de instrumentar la irrigación se completó usando 5 ml de EDTA al 17% (MD-Cleanser, MetaBiomed) durante 5 minutos

dado que en el estudio de Emboava et al. (2009) se recomienda el uso de EDTA de 1-5 minutos (se irriga con solución salina de forma intercalada entre hipoclorito de sodio y EDTA), seguido de 5 ml de NaOCl al 2.5 %, el tiempo total de riego para la secuencia de riego final fue de 2 minutos. Se realizó el movimiento de entrada y salida del conducto durante la administración de la solución sin llegar a retirar la aguja en su totalidad, posteriormente, se irriga con 5 ml de agua bidestilada.

7. Posteriormente las muestras se lavaron con agua destilada durante 10 minutos.
8. El exterior de cada espécimen radicular se cubrió con dos capas de barniz de uñas (incluyendo el tercio apical y toda la superficie radicular, evitando barnizar el extremo recortado y la entrada del conducto), esto con la finalidad de evitar filtraciones a través de los túbulos dentinarios y retener de una mejor manera el inóculo. Además, se le asignó de forma aleatoria a cada una de las muestras un color: verde (ácido etidróico), azul (solución salina 0.9%), rojo (N acetilcisteína) y morado (EDTA +hipoclorito de sodio).

Posteriormente, cada espécimen se colocó dentro de un tubo eppendorf al cual se le colocó 0.5 ml de agar de infusión cerebro corazón (BHI) para esterilizarlo durante 30 min a 121 C y se incubó durante 48 horas a 37°C.

El caldo BHI se inspeccionó a las 48 horas para asegurar la ausencia de signos de turbidez para controlar la esterilidad (Mittal et al., 2012).

9. Posteriormente se inocularon 25 microlitros de *E. faecalis* en cada una de las muestras, al tercer día se eliminó con una micropipeta 500 microlitros del líquido contenido en el tubo eppendorf cual contenía el órgano dental y se colocaron 600 microlitros de BHI. Esto se repitió cada 72 horas. Las 60 muestras se incubaron durante un total de tres semanas a 37 ° C, debido a que se ha demostrado que las biopelículas maduras de 3 semanas de edad son más resistentes a los agentes desinfectantes que las bacterias planctónicas y las biopelículas jóvenes (Shen et al., 2011).
10. Después del período de incubación, las muestras se retiraron de cada tubo y se lavaron con solución salina al 0.9% estéril.
11. Los especímenes fueron divididos en 4 grupos dependiendo los irrigantes utilizados (N-acetilcisteína 200 mg/ml, ácido etidróico 9% con hipoclorito de sodio 2.5%, hipoclorito de sodio 2.5% + EDTA 17% y solución salina 0.9%) y cada grupo estuvo compuesto de 15 órganos dentales.
12. La conformación de los conductos se realizó cerca de dos mecheros de Bunsen encendidos y utilizando el sistema rotatorio ProTaper Universal Dentsply Sirona (Maillefer Dentsply, Ballaigues, Suiza), a una velocidad de 250 rpm, la secuencia fue la siguiente: SX (0.19/.04), S1 (0.18/.02), S2 (0.20/.04), F1 (0.20/.07), F2 (.025/.08), F3 (0.30/.09). Los instrumentos ProTaper Universal Dentsply Sirona (Maillefer Dentsply, Ballaigues, Suiza) SX, S1 y S2 se utilizaron para ampliar la entrada del conducto creando un acceso en línea recta. Posteriormente, se logró la instrumentación rotativa utilizando S1, S2, F1, F2 y F3 a la longitud de trabajo. Se irrigó con la sustancia correspondiente cada grupo durante la instrumentación.
13. Se irrigó cada espécimen con una jeringa de plástico desechable de 5 ml (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EE. UU.) a la cual se le colocó una endo eze (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EE. UU) aguja metálica fina y roma (27 ga, Ø 0,40 mm) con un extremo antiobturante único. La punta cuenta con una abertura a un lado para irrigación lateral, colocada

pasivamente en el conducto hasta 1 mm desde el foramen apical. Se irriego constantemente entre lima y lima con diferentes irrigantes dependiendo el grupo:

❖ **Grupo solución salina 0.9% (15 órganos dentales):** Se irriego con solución salina 0.9% (15 ml) entre cada instrumento y se permitió que el irrigante permaneciera en el conducto al finalizar durante 2 minutos.

❖ **Grupo N- acetilcisteína 200mg/ml (15 órganos dentales):** La solución de NAC a una concentración de 200 mg / ml (Sigma, catalogo A7250-5G) se preparó disolviendo 5 g en 5 ml de agua destilada estéril de acuerdo con Quah et al. (2012) para así obtener 1 gramo por cada mililitro, se colocó 1 mililitro de N-acetilcisteína en 24 mililitros, por lo tanto se obtuvieron 25 ml en el cual cada mililitro contenía 0.04g de N-acetilcisteína y en cada muestra se irriego con 5 mililitros por lo que se utilizó la concentración indicada de 200mg/ml en cada muestra (dado que $0.04g \times 5 \text{ ml} = .2 \text{ gramos}$ (200mg/ml)) y se dejó dentro del conducto durante 5 minutos, posteriormente se realizó un lavado final usando 4 ml de agua destilada estéril en cada muestra.

La preparación del irrigante se realizó tres veces, dado que primero fueron tratados 5 órganos dentales y después otros 5 y así sucesivamente hasta terminar las pruebas de irrigación de los 15 órganos dentales correspondientes a este grupo.

❖ **Grupo hipoclorito de sodio al 2.5% y ácido etidróico al 9% (15 órganos dentales):** el ácido etidróico (Sigma-Aldrich, catalogo H6773-100G) se obtuvo en una solución acuosa al 60%, sin embargo, para la investigación se requirió al 9%, por lo que se mezcló con agua bidestilada para obtener el porcentaje de concentración necesario. Siguiendo el protocolo recomendado por Arias-Moliz et al. (2016) ambos irrigantes se mezclaron en una proporción 1:1. Con lo cual se obtendrían 10 mililitros de solución para cada una de las muestras (5 piezas), 5 ml durante la instrumentación y 5 ml como irrigante

final a 1 mm de la longitud de trabajo durante 3 min. Posteriormente, se enjuagaría el conducto con 5 ml de agua bidestilada (Lottanti et al., 2009).

Para lograr esto se requirieron 50 ml de la solución resultante entre NaOCl 2.5% y etidronato al 9%, por lo que se procedió a recolectar 25 ml de etidronato al 9%, lo cual se obtuvo tomando de 25 ml de etidronato al 60% y solo se tomó 3.75 ml lo cual se combinó con 21.25 ml de agua bidestilada logrando así obtener 25 ml de etidronato al 9%, el cual se mezcló con 25 ml de NaOCl al 2.5%, lo cual fue recomendado por diversos artículos, sin embargo al mezclarlos dentro de un matraz, las soluciones sufrieron una reacción negativa, dado que al mezclarse la sustancia liberó gases tóxicos, y hubo un aumento en la temperatura por lo cual se consideró inapropiado y peligroso utilizarlo en combinación durante la irrigación. Por lo que se decidió, dado que Arias-Moliz et al. (2016) menciona que el etidronato por sí mismo mostro un efecto bactericida, probarlo contra *E.faecalis* y comparar los resultados con los obtenidos en la irrigación convencional y con N-acetilcisteína además de solución salina 0.9%.

Por lo que se procedió a realizar nuevamente la dilución del irrigante el cual se obtuvo tomando de 50 ml de etidronato al 60% solo 7.5 ml los cuales se mezclaron con 42.5 ml de agua bidestilada, por lo tanto se utilizó el protocolo de irrigación de Lottanti et al. (2009), como se tenía previsto pero solo con etidronato al 9%, el cual consistió en irrigar con un volumen de 10 ml en total por cada órgano dental (5 órganos de dentales), 5 ml durante la instrumentación y 5 ml como irrigante final a 1 mm de la longitud de trabajo durante 3 min. Posteriormente, se enjuago el conducto con 5 ml de agua bidestilada (Lottanti et al., 2009).

La preparación del irrigante se realizó tres veces, dado que primero fueron tratadas 5 órganos dentales y después otras 5 y así sucesivamente

hasta terminar las pruebas de irrigación en los 15 órganos dentales correspondientes a este grupo.

- ❖ **Grupo hipoclorito de sodio al 2.5% + EDTA al 17%** (15 órganos dentales): durante la preparación quimiomecánica del conducto radicular, a cada lima le siguió una irrigación con 1 ml de NaOCl al 2.5% (Debido a que los efectos tóxicos del NaOCl aumentan a concentraciones más altas mientras que los efectos antibacterianos dentro del canal siguen siendo los mismos, por ello se utilizó NaOCl al 2.5%). Al terminar de instrumentar la irrigación se completó usando 5 ml de EDTA al 17% (MD-Cleanser, MetaBiomed) durante 5 minutos dado que en el estudio de Emboava et al. (2009) se recomienda el uso de EDTA de 1-5 minutos (se irriga con solución salina de forma intercalada entre hipoclorito de sodio y EDTA), seguido de 5 ml de NaOCl al 2.5 %, el tiempo total de riego para la secuencia de riego final fue de 2 minutos. Se realizó el movimiento de entrada y salida del conducto durante la administración de la solución sin llegar a retirar la aguja en su totalidad, posteriormente, se irrigó con 5 ml de agua bidestilada.
- ❖ Cabe mencionar que todas las soluciones se prepararon justo antes de los experimentos.

14. Al terminar con la instrumentación e irrigación de los órganos dentales, se utilizó un disco de diamante y una pieza de baja para cortar los 5 mm apicales de cada uno de los especímenes debido a que según Schlingemann R y Schafer E (2003) el desbridamiento del tercio apical de los conductos es menor que el de los tercios coronal y medio, posteriormente se colocaron tubos ependorf con 1 ml BHI estéril, y los 5 mm de órgano dental que fue cortado, se sujetó con unas pinzas

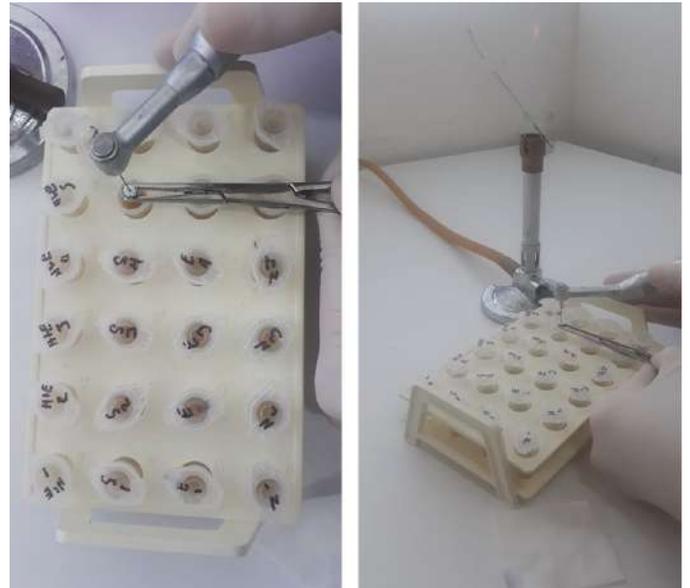


Figura 2: Recolección de polvo dentinario en medio BHI, mediante el uso de fresas Gates Glidden #3, cerca de mechero de Bunsen.

encima del tubo eppendorf abierto, y se procedió a utilizar una fresa Gates Glidden #2 (0.70) el polvo dentinario cayo dentro del tubo (Figura 2) y fue incubado por 24 horas a 37 ° C, tiempo en el cual el polvo dentinario se decantó en lo profundo del tubo (Figura 5).

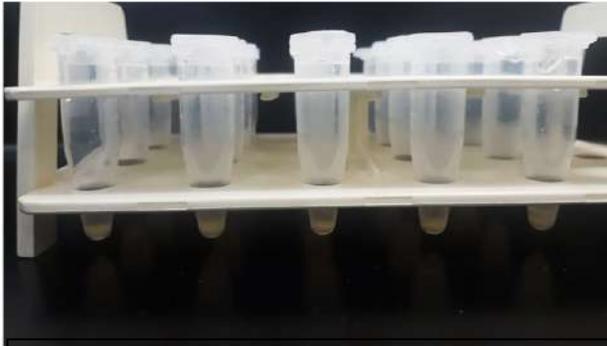


Figura 5: Decantación de dentina.

15. Después de 24 horas, de forma aleatoria se tomó una muestra de cada grupo para realizar un cultivo en agar infusión cerebro corazón (BHI), por lo cual se extrajo con una micropipeta 10 microlitros de cada una de las muestras seleccionadas y se

colocaron en 990 microlitros de medio de cultivo y se realizó una dilución seriada la cual consistió en tomar de la muestra obtenida (10 microlitros obtenidos de la muestra más 990 microlitros de medio) 10 microlitros y colocarla en otro tubo eppendorf con 990 microlitros de medio, y así sucesivamente hasta llegar a 6 diluciones.

Con el contenido de cada dilución se realizó un cultivo mediante la técnica de extensión superficial en placa la cual consistió en:

- ❖ Marcar las bases de las cajas con los datos pertinentes antes de inocular.
- ❖ Se inoculo 0.10 microlitros en cada caja con una micropipeta estéril, distribuyéndolo de manera homogénea con una varilla de vidrio estéril (en forma de escuadra o "L") haciendo movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo, hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; se esperó a la absorción completa del inóculo



Figura 6: se observan UFC de *E. faecalis*. en el cultivo de la muestra de N-acetilcisteína en su cuarta dilución.

antes de incubar aproximadamente 10 minutos. Se incluyo una caja sin inóculo como testigo de esterilidad. Se incubaron las cajas en posición invertida durante 24 horas a 37°C.

❖ Al paso de 24 horas se revisaron las cajas petri y se realizó el conteo de UFC (Figura 6), lo cual nos brindó la relación entre niveles de absorbancia y UFC.



Figura 3: se observan 5 muestras de cada grupo estudiado, además de una muestra de agua y de BHI, al lado de una micropipeta con la cual se obtuvo la muestra.

16. Posteriormente se tomó 800 microlitros de la parte superior del BHI para evaluar la densidad óptica de cada muestra usando un espectrofotómetro (SP-V1100, DLAB Scientific CO, China) a una longitud de onda de 400, 600 y 800 nm (Figura 3 y 4).

Primero se colocaron 4 celdas las cuales contenían: agua,

BHI, muestra 1 y muestra 2. Después de obtener los resultados de las cuatro sustancias a las tres densidades ópticas descritas anteriormente, se obtuvieron los valores de absorbancia traduciéndose, números más altos indican una mayor presencia de microorganismos y un menor efecto antibacteriano del irrigante. Guiándonos por la ley de Beer Lambert, el cual dice que cuando una luz de longitud de onda específica atraviesa una muestra, la fracción de radiación absorbida por la muestra será función de la



Figura 4: se observan las muestras a punto de ser analizadas por medio del espectrofotómetro (SP-V1100, DLAB Scientific CO, China).

concentración de sustancia en la trayectoria de la luz.

Después se colocaron las muestras delante de un fondo blanco con líneas negras, para visualmente detectar si existía turbidez (Figura 7).

Por Ultimo los datos obtenidos y escritos en Excel se evaluaron mediante pruebas estadísticas por medio de GraphPad Software Inc.

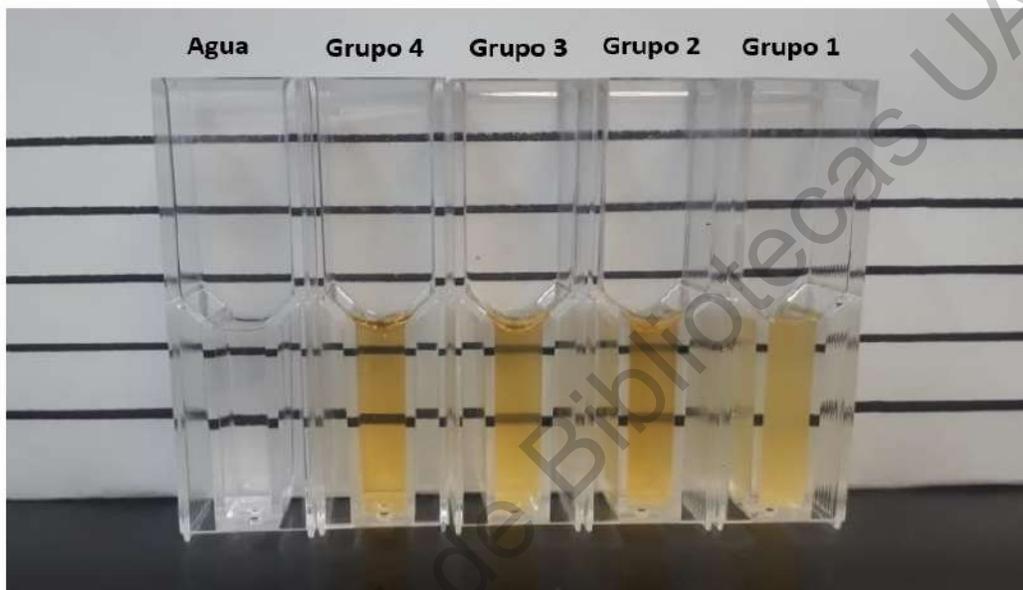


Figura 7: Se observa la turbidez de las muestras.

Grupo 1: Muestra irrigada con solución salina al 0.9%

Grupo 2: Muestra irrigada con N-acetilcisteína 200 mg/ml

Grupo 3: Muestra irrigada con Etidronato al 9%

Grupo 4: Muestra irrigada con hipoclorito de sodio al 2.5% + EDTA al 17%

VI.5.1 Análisis estadístico

Los datos se evaluaron primeramente por la prueba de kolmogórov-Smirnovp por medio de GraphPad Software Inc., los cuales dieron como resultado una distribución normal por lo que posteriormente se realizaron pruebas paramétricas, el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y comparación múltiple de Post Hoc Tukey para la significación estadística y prueba de Chi2 para analizar la distribución de distintos intervalos según la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en los cuatro grupos de estudio.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VII. Resultados

Los resultados de los niveles de absorbancia de los cuatro grupos de estudio (solución salina 0.9%, N-acetilcisteína 200mg/ml, etidronato al 9%, NaOCl 2.5% + EDTA 17 %) a una densidad de 400 nm se muestran en la tabla 1. El promedio del nivel de absorbancia fue de 1.640 ± 0.272 en el grupo que fue irrigado con solución salina 0.9%; el grupo que utilizó N-acetilcisteína 200 mg/ml presentó un promedio de 1.419 ± 0.241 , el que usó etidronato 9% obtuvo un promedio de 1.424 ± 0.257 y por último el hipoclorito de sodio 2.5% + EDTA 17% tuvo un promedio de 1.166 ± 0.183 . Se observó una diferencia estadísticamente significativa de < 0.0001 .

Por lo que se realizó una comparación entre los irrigantes y sus niveles de absorbancia para analizar entre cuáles de ellos existía una diferencia estadísticamente significativa, lo cual se muestra en la tabla 1.1.

Tabla 1. Comparación de la absorbancia detectada en los cuatro grupos de estudio a una longitud de onda de 400 nm.

	Solución salina (Grupo control) (n=15)	N-Acetilcisteína (n=15)	Etidronato (n=15)	NaOCl + EDTA (n=15)	P-Valor
	<i>X ± D.E. (Rango)</i>				
Absorción óptica a 400 nm	1.640 ± 0.272 (1.278 – 1.997)	1.419 ± 0.241 (1.069 – 1.895)	1.424 ± 0.257 (1.118 – 1.974)	1.166 ± 0.183 (0.948 – 1.495)	< 0.0001

X: Promedio; **(n):** Numero de órganos dentales, **D.E:** Desviación estándar, **NaOCl:** Hipoclorito de sodio, **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético. ANOVA de una Vía.

Tabla 1.1 Comparación entre los diversos irrigantes utilizados.

Comparación entre Irrigantes	Estadísticamente significativo
Solución salina vs N-Acetilcisteína	No
Solución salina vs Etidronato	No
Solución salina vs Hipoclorito de sodio + EDTA	Si
N-Acetilcisteína vs Etidronato	No

N-Acetilcisteína vs. Hipoclorito de sodio + EDTA Si

Etidronato vs. Hipoclorito de sodio + EDTA Si

Prueba estadística Post Hoc.

Los resultados obtenidos del número de UFC de *E. faecalis* de los cuatro grupos de estudio (solución salina, N-acetilcisteína, etidronato, NaOCl + EDTA) se muestran en la tabla 2. Aunado a esto se realizó una comparación entre los irrigantes para evaluar entre cuál de ellos existía una diferencia estadísticamente significativa lo cual se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2. Comparación del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en los cuatro grupos de estudio.

	Solución salina (Grupo control) (n=15)	N-Acetilcisteína (n=15)	Etidronato (n=15)	NaOCl + EDTA (n=15)	P- Valor
	<i>X ± D.E. (Rango)</i>				
UFC	898,536 ± 148,698 (699,803 – 1,093,510)	777,485 ± 131,772 (585,359– 1,037,657)	780,260 ± 140,462 (612,190 – 1,080,916)	638,985±100,320 (519,102 – 818,627)	< 0.0001

X: Promedio; **(n):** Numero de órganos dentales, **D.E:** Desviación estándar, **NaOCl:** Hipoclorito de sodio, **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético, UFC: unidades formadoras de colonias. ANOVA de una Vía.

Tabla 2.1 Comparación entre los diversos irrigantes utilizados respecto a UFC.

Comparación entre Irrigantes	Estadísticamente significativo
Solución salina vs N-Acetilcisteína	No
Solución salina vs Etidronato	No
Solución salina vs Hipoclorito de sodio + EDTA	Si
N-Acetilcisteína vs Etidronato	No
N-Acetilcisteína vs Hipoclorito de sodio + EDTA	Si
Etidronato vs. Hipoclorito de sodio + EDTA	Si

Prueba estadística Post Hoc.

Para facilitar el entendimiento de los resultados obtenidos del número de unidades formados de colonias de *E. faecalis*, se realizó una tabla que muestra la distribución de distintos intervalos según la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) obtenidos en los cuatro grupos de estudio.

Tabla 3. Distribución de distintos intervalos según la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en los cuatro grupos de estudio.

Intervalos de UFC	Sol. salina (fi) (Grupo control) (n=15)	N- acetilcisteína (fi) (n=15)	Etidronato (fi) (n=15)	NaOCl + EDTA (fi) (n=15)	P- Valor
	Frecuencia (%)				
[500,000 - 600,000)	0 (0%)	1 (6.667 %)	0 (0%)	7 (46.667 %)	
[600,000 - 700,000)	1(6.667 %)	3 (20%)	5 (33.33%)	2 (13.33 %)	
[700,000 - 800,000)	4 (26.667 %)	4 (26.667 %)	5 (33.33%)	5 (33.33%)	0.0038
[800,000 - 900,000)	2 (13.33 %)	4 (26.667 %)	2 (13.33 %)	1 (6.667 %)	
[900,000 -1,000,000)	3 (20%)	2 (13.33 %)	2 (13.33 %)	0 (0%)	
[1,000,000 -1,100,000)	5 (33.33%)	1 (6.667 %)	1 (6.667 %)	0 (0%)	

(n): Numero de órganos dentales, fi: frecuencia absoluta, UFC: unidades formadoras de colonias, NaOCl: Hipoclorito de sodio, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Prueba de Chi²

VIII. Discusión

Los microorganismos que sobreviven al desbridamiento quimiomecánico del sistema de conductos radiculares o que persisten dentro de los materiales de relleno restantes (gutapercha / sellador) pueden inducir el fracaso del tratamiento endodóntico en circunstancias favorables (Ricucci et al., 2009).

Por lo tanto, el objetivo principal del tratamiento de endodoncia es reducir los microorganismos del sistema de conductos radiculares infectados a niveles compatibles con la curación (Siquiera et al., 2008).

Aunque idealmente las bacterias adheridas deberían eliminarse mediante métodos mecánicos, la alta complejidad de la anatomía transversal del sistema de conductos radiculares reduce la eficacia de los instrumentos endodónticos (Nair et al., 2005). Sumado a esto la capacidad de *E. faecalis* para formar biopelículas puede ser un factor que contribuye a su persistencia después de los tratamientos de conductos (Kishen et al., 2006), debido a que las superficies rugosas pueden mejorar la adhesión de bacterias, una superficie lisa y limpia del conducto radicular es el resultado clínico ideal del tratamiento de limpieza y modelado radicular (Hu et al., 2010).

En consecuencia, para incrementar el proceso de desinfección, se utilizan soluciones irrigantes antimicrobianas durante el tratamiento endodóntico para mejorar la capacidad de obtener un conducto radicular libre de bacterias (Shuping et al., 2000) por lo cual, durante la investigación se evaluaron 4 grupos de irrigantes, con el objetivo de determinar cuál de ellos presentaba una mayor capacidad para eliminar *E. faecalis*, esto se cuantificó por medio de un espectrofotómetro (niveles de absorbancia) y medio de cultivo.

La densidad óptica varió en proporción a la cantidad de bacterias. Se encontró que las densidades ópticas de los cuatro grupos eran estadísticamente significativas ($p < 0.0001$).

El menor nivel de absorbancia obtenido fue en el grupo irrigado con hipoclorito de sodio 2.5% + EDTA 17% teniendo un promedio de 1.166 ± 0.183 con un número proporcional de UFC $638,985 \pm 100,320$ esto no fue una sorpresa dado que el NaOCl presenta una actividad antimicrobiana in vitro bien reconocida por su capacidad para disolver materia orgánica (Naenni et al., 2004) y alterar el biofilm (Bryce et al., 2009), además de que este método de limpieza química implica la disolución de los restos de pulpa orgánica (NaOCl 2.5%) y la capa de barrillo dentinario de la dentina radicular (EDTA 17%) sin embargo, la presencia de bacterias en el conducto en las muestras se puede atribuir a diversos factores tales como: el hipoclorito de sodio disminuye sus niveles de cloro al entrar en contacto con la dentina por lo tanto su capacidad bactericida se ve afectada (Camps et al., 2009), Otra posibilidad es que la capa de frotis actuó como barrera impidiendo la difusión de los irrigantes a través de las paredes de la dentina infectada y dentro de los túbulos dentinarios (Clark-Holke et al., 2003), además la reactividad del NaOCl con los componentes orgánicos de la capa de frotis podría acelerar el consumo del cloro libre disponible, inactivando así la solución (Macedo et al., 2010). Por lo tanto se utilizó EDTA 17% sin embargo al utilizar EDTA, la superficie de dentina es desmineralizada debido a esto la superficie de la dentina expone el colágeno y crea un tejido ideal para la adherencia por *E. faecalis* (Hubble et al., 2003) lo cual se lleva a cabo por la serina proteasa y posiblemente la gelatinasa son factores potencialmente de virulencia que dan a *E. faecalis* la capacidad de unirse a la dentina (Yang et al., 2006), sumado a esto recordemos que el colágeno es un sustrato nutricional de *faecalis* (Kowalski et al., 2006) lo cual le brinda mayor oportunidad de supervivencia a la bacteria.

En segundo lugar, en niveles de absorbancia y UFC y por ende una menor eliminación de bacterias a comparación de hipoclorito de sodio 2.5% + EDTA 17% se encuentra el grupo que fue irrigado con etidronato 9% con un promedio de absorbancia de 1.424 ± 0.257 y $780,260 \pm 140,462$ UFC, esto se atribuye en el estudio de Arias-Moliz et al., (2016) a su alto pH 11,69 y aunado a esto *E. faecalis* no puede sobrevivir en un entorno alcalino (Evans et al., 2002), sin embargo la menor erradicación de *E. faecalis* se podría atribuir a que este pH es difícil de

mantener en el medio dentinario debido a varios factores. En primer lugar, *E. faecalis* está dotado de la capacidad de mantener activa o pasivamente la homeostasis del pH intracelular a través de bombas de protones o protones de difusión pasiva a través de su membrana celular (McHugh et al., 2004). En segundo lugar, la dentina es un buen sustrato que reduce eficazmente la extrema alcalinidad de los irrigantes, esto podría explicar porque se redujo su efecto antibacteriano. Pese a esto se esperaba un resultado a un mayor de erradicación de *E. faecalis* dado que en otros estudios mostro actividad antimicrobiana por ejemplo contra *Candida Albicans* (Karale et al.,2016). Otro aspecto relevante que mencionar fue la interacción que se dio durante el experimento al colocar hipoclorito de sodio al 2.5% y etidronato al 9 % dentro de un matraz, lo cual llevo a la liberación de gases y a su vez un aumento en la temperatura de la sustancia contenida en el matraz, sobre lo cual cabe mencionar, hasta el momento no se ha encontrado evidencia en la literatura que respalde este suceso, por lo cual se considera un punto importante a investigar.

En un punto intermedio encontramos al grupo que fue irrigado con N-acetilcisteína 200 mg/ml, con un promedio de absorbancia de 1.419 ± 0.241 y $777,485 \pm 131,772$ UFC lo cual fue una sorpresa dado reduce la producción de EPS, lo que reduce la adhesión bacteriana a las superficies y altera la madurez (Silveira et al., 2013), de hecho investigaciones han demostrado que la NAC tiene efectos antibacterianos y antibiofilm contra patógenos orales como *Prevotella intermedia* (Moon et al., 2015) y *E. faecalis* (Quah et al., 2012), lo cuales se encuentran a menudo en infecciones endodónticas

Aunado a esto, artículos como el de Choi et al., (2018) reportaron que NAC mostró una gran eficacia en la eliminación y destrucción de células presentes en una biopelícula madura multiespecie (*Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus mutans* y *E. faecalis*) en bloques de dentina humana estériles, lo cual su vez demostró que la N-acetilcisteína no se ve alterada por la dentina, cabe destacar que la biopelícula madura fue incubada por tres semanas lo cual lo hace más resistente a los agentes desinfectantes que las bacterias

planctónicas y las biopelículas jóvenes (Shen et al.,2011), esto demostró el uso potencial de NAC en el tratamiento del conducto radicular. Sin embargo, el comportamiento farmacocinético y la eficacia de NAC diferirán en diferentes condiciones de pH (Noszál et al.,2000) por lo tanto, esto pudo afectar los resultados durante la investigación.

En el análisis estadístico no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos correspondientes a solución salina 0.9% la cual tuvo una absorbancia de 1.640 ± 0.272 y $898,536 \pm 148,698$, N-acetilcisteína 200 mg/ml y etidronato 9%, sin embargo, esto puede explicarse por un tamaño de muestra pequeño, por lo que esto abre un nuevo panorama de investigación al probar que si bien su efecto en este estudio no fue equiparable con el grupo que fue irrigado con hipoclorito de sodio 2.5% + EDTA 17%, los irrigantes N-acetilcisteína 200mg/ml y etidronato 9%, tienen un alto potencial, dado que por ejemplo la N acetilcisteína a probado ejercer actividad antiinflamatoria al inhibir la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por LPS (IL-1B, IL-6 y IL-8) en células fagocíticas y fibroblastos gingivales en el artículo publicado por Toker et al., (2009), por lo tanto la extrusión de la solución en el tejido periradicular no representaría un riesgo para el paciente a comparación del NaOCl el cual tiene un efecto adverso sobre los tejidos vitales y es tóxico para los tejidos perirradiculares (Hulsmann et al., 2000) . además de otros artículos que demuestran la capacidad antibacteriana de la N-acetilcisteína contra patógenos orales (Quah, 2012; Darrag, 2013) sin embargo, aunque la NAC muestra una buena eficacia antimicrobiana y de erradicación de biopelículas y tiene potencial como método de irrigación o tratamiento de los conductos radiculares infectados, los efectos a corto y largo plazo de la NAC en la dentina se desconocen actualmente y quedan por probar.

El etidronato como se observó en la investigación, si cuenta con la capacidad de erradicar *E.faecalis*, sin embargo falta profundizar sobre las concentraciones necesarias para lograr un mayor efecto bactericida, o los efectos que estos puedan desencadenar, de hecho es pertinente recordar que el etidronato pertenece a la familia de los bifosfonatos, los cuales cuando se

administran sistémicamente se relacionan con osteonecrosis mandibular o maxilar pese a esto no presenta por el momento ser un riesgo para el paciente (osteonecrosis) dado que no han aparecido informes relacionados con el etidronato, solo con otros bifosfonatos con una capacidad mucho mayor para inhibir la función de los osteoclastos (Krueger et al., 2007).

En conclusión, los datos demostraron que ninguna de las soluciones de irrigación del conducto radicular probadas elimina completamente *E. faecalis*, sin embargo, el valor medio más bajo de UFC se observó con la solución de hipoclorito de sodio 2.5% + EDTA 17% seguida de las soluciones ácido etidrónico 9% y N-acetilcisteína, mientras que el valor medio más alto se encontró con el grupo de control en el cual se utilizó solución salina 0.9%.

IX. Conclusiones

La irrigación convencional utilizando hipoclorito de sodio 2.5% + EDTA 17% muestra nuevamente su eficiencia y superioridad como irrigante, al mostrar estadísticamente significancia (0.0001) en comparación con etidronato 9%, N-acetilcisteína 200 mg/ml y solución salina 0.9% al erradicar mayor cantidad de *E. faecalis*. según los niveles de absorbancia y UFC obtenidos en las muestras.

No existe diferencia estadísticamente significativa entre el etidronato 9%, N-acetilcisteína 200 mg/ml y solución salina 0.9% al ser utilizados como irrigantes contra *E. faecalis*, sin embargo se observó una disminución en los niveles de absorbancia y UFC en N-acetilcisteína 200 mg/ml y etidronato 9% por lo tanto si tienen la capacidad de eliminar bacterias en comparación con solución salina 0.9%, además se observó que el Etidronato al 9% tuvo mayor eficacia contra *E. faecalis* que N-acetilcisteína 200 mg/ml pese a no ser estadísticamente significativo.

IX. Propuestas

- ❖ Se propone investigar la interacción bioquímica entre las soluciones: etidronato e hipoclorito de sodio, en sus diferentes concentraciones relacionados a la eliminación de biopelículas y barrillo dentinario.
- ❖ Se propone investigar si existe alguna interacción entre hipoclorito de sodio y N-acetilcisteína como irrigantes debido a la ausencia de información publicada al respecto.
- ❖ También se podría investigar sobre como funcionaria e interactuarían entre si el ácido etidróico al 9% y N-acetilcisteína 200 mg/ml, como irrigantes dentro del conducto radicular y los efectos que tendrían en la dentina.
- ❖ Es posible afirmar que, a excepción de la solución salina, todos los regímenes de irrigación probados redujeron el número de *E. faecalis*, por lo tanto, es necesario profundizar sobre métodos alternativos que puedan brindar una reducción mayor del número de bacterias encontradas en los conductos radiculares sin ser tóxicos.

X. Bibliografía

1. Arias-Moliz, M.T., Ordinola-Zapata, R., Baca, P., Ruiz-Linares, M., Ferrer-Luque, C.M. 2014. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. *J. Endod.* 40:1-4
2. Akhlaghi, M.N., Dadresanfar, B., Darmiani, S., Moshari, A. 2014. Effect of master apical file size and taper on irrigation and cleaning of the apical third of curved canals. *J Dent* .11(2):188-95.
3. Baca P., Junco P., Arias-Moliz M.T., González-Rodríguez M.P., Ferrer-Luque C.M. 2011. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod.* 37(3):363–6.
4. Barret, M.T. 1917. The Dakin-carrel antiseptic solution. *Dent Cosmos.* 59: 446-448.
5. Baumgartner, J.C., Mader, C.L. 1987. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation systems. *J Endod.* 13: 147–57.
6. Bedir, S.S., Mossa, H., Hassan, A.M., Etidronate as a weak chelating agent on root canal dentin : an pppdate review. *J. Clin. Diagnostic Res.* 11(12): 05-09
7. Buck, R., Eleazer, P.D., Staat, R.H. 1999. *In vitro* disinfection of dentinal tubules by various endodontics irrigants. *J Endod.* 25(12):786–8.
8. Bulger, E.M., Maier, R.V. 2001. Antioxidants in critical illness. *Arch. Surg.* 136:1201–1207.
9. Camps, J., Pommel, L., Aubut, V. 2009. Shelf life, dissolving action, and antibacterial activity of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 108:66–73.
10. Clark-Holke, D., Drake, D., Walton, R. 2003. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. *J Dent.* 31:275–81
11. Choi, Y.S., Kim, C., Moon, J.H., Lee, J.Y. 2018. Removal and killing of multispecies endodontic biofilms by N-acetylcysteine. *Brazilian J Microbiol* . 49(1):184–8.
12. Cindy, H.R., Rene, H.D., Sergio, G.R., Diana, R.P., Claudio, C.R. 2013. Rifampicin and N-acteylcisteyne inhibit oral bacterial growth and biofilm

- formation. *Pharma Innov J.* 2:16–23.
13. Coons, D., Dankowski, M., Diehl, M. 1987. Performance in detergents, cleaning agents and personal care products: detergents. *Falbe J.* 197–305.
 14. Dakin, H.D. 1915. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *Br Med J.* 2(2852):318–320.
 15. Darrag, A.M. 2013. Antimicrobial efficacy of endodontic irrigation solutions against planktonic microorganisms and dual-species biofilm. *Tanta Dent J.* 10(3):129–37.
 16. De-Deus, G., Di Giorgi, K., Fidel, S., Fidel, R.A., Paciornik, S. 2009. Push-out bond strength of resilon/epiphany and resilon/epiphany self-etch to root dentin. *J Endod.* 35(7):1048–50.
 17. De-Deus, G., Namen, F., Galan, J., Zehnder, M. 2008. Soft chelating irrigation protocol optimizes bonding quality of resilon/epiphany root fillings. *J Endod.* 34(6):703–5.
 18. De-Deus, G., Zehnder, M., Reis, C., Fidel, S., Fidel, R.A., Galan, J. 2008. Longitudinal co-site optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. *J Endod.* 34(1):71–5.
 19. Deng, D.M., Hoogenkamp, M.A., Exterkate, R.A., Jiang, L.M., Van der Sluis L.W., Cate, J.M. 2009. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J Endod.* 35(9):1249-52
 20. Drake, D.R., Wiemann, A.H., Rivera, E.M., Walton, R.E. 1994. Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. *J Endod.* 20:78–82
 21. Du, T., Shi, Q., Shen, Y., Cao, Y., Ma, J., Lu, X., Xiong, Z., Haapasalo, M. 2003. Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. *J. Endod.* 39, 1438–1443.
 22. El-Feky, M.A., El-Rehewy, M.S., Hassan, M.A., Abolella, H.A., Abd El-Baky, R.M., Gad G.F. 2009. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Pol. J. Microbiol.* 58; 261–267.

23. Ehsani, M., Moghadamnia, A., Zahedpasha, S., Ghorban, G., Haghanifar, S., Aghajanpour, S.M. 2012. The role of prophylactic ibuprofen and N-acetylcysteine on the level of cytokines in periapical exudates and the post-treatment pain. *J Pharm Sci.* 20(1): 30.
24. Estrela, C.S., Alencar, A.H., Lles, C.R., Decurcio, D.A. 2008. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus Faecalis*- A systematic review. *J Appl Oral Sci.* 16(6):364-8.
25. Evans, M., Davies, J.K., Sundqvist, G., Figdor, D. 2002. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. 1:221–8.
26. Falcón Guerrero, B.E., Guevara, L.Y. 2019. Interacciones entre soluciones irrigantes durante el tratamiento de endodoncia. *Rev Médica Basadrina.* 11(1):56–9.
27. Ferraz, C.C. 2001. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 27(7):452–5.
28. Fletcher, M. 1991. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv Microb Physiol.* 32:53–85.
29. George, S., Kishen, A., Song, K.P., 2005. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 31(12):867-72
30. Gilbert, P., Das, J., Foley, I. 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res.* 11:160–7.
31. Girard, S., Paqué, F., Badertscher, M., Sener, B., Zehnder, M. 2005. Assessment of a gel-type chelating preparation containing 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate. *Int Endod J.* 38(11):810–6.
32. González-López, S., Camejo-Aguilar, D., Sanchez-Sanchez, P., Bolaños-Carmona, V. 2006. Effect of CHX on the decalcifying effect of 10% citric acid, 20% citric acid or 17% EDTA. *J Endod.* 32:781– 4.
33. Goodman y Gillman's. 2006. *The pharmacological basis of therapeutics.* , eds. 11th ed, McGraw Hill Medical Publicating Division, New Delhi, 2006;1666-68.
34. Grande N.M., Plotino G., Falanga A., Pomponi M., Somma F. 2006. Interaction

between EDTA and sodium hypochlorite: a nuclear magnetic resonance analysis. J Endod. 32(5):460–4.

35. Haapasalo, M., Qian, W., Portenier, I., Waltimo, T. 2007. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. J Endod. 33:917–25.
36. Hancock, H.H., Sigurdsson, A., Trope, M., Moiseiwitsch, J. 2001. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod. 91:579 – 86.
37. Heckendorff, M. 2003. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. Int Endod J. 36; 810–30.
38. Hennequin, M., Pajot, J., Avignant, D. 1994. Effects of different pH values of citric acid solutions on the calcium and phosphorus contents of human root dentin. J Endod. 20(11):551–4.
39. Hu, X., Peng, Y., Sum, C.P., Ling, J. 2010. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteination: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy study. J Endod. 36(12):2008-11.
40. Hu, X., Ling, J., Gao, Y. 2010. Effects of irrigation solutions on dentin wettability and roughness. J Endod. 36:1064–7.
41. Hubble, T.S., Hatton, J.F., Nallapareddy, S.R. 2003. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, ace, on adhesion to dentin. Oral Microbiol Immunol. 18:121–6
42. Hulsmann, M., Hahn, W. 2000. Complications during root canal irrigation—literature review and case reports. Int Endod J. 33:186–93
43. José, F., Siqueira, Jr y Isabela, N. Rôças. 2011. Microbiología y tratamiento de las infecciones endodónticas. Cohen S, Burns R, Vías de la pulpa. 10ma edición. Editorial Elsevier. España. 559.
44. Hurtado, C., Pérez-Giraldo, C., Rodríguez-Benito, A., Morán, F.J., Blanco, M.T., Gómez-García, A.C. 1997. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother. 39(5):643–6.

45. Kakehashi, S., Stanley, H., Fitzgerald, R. 1965. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 20:340-9.
46. Karale, R., Odedra, K.M., Sirekha, A., Champa, C., Shetty, A., Pushpalatha, S. 2016. Effect of dentin on the antimicrobial efficacy of 3% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, 17% ethylenediaminetetraacetic acid, and 18% etidronic acid on *Candida albicans*: An *in vitro* study. *J Conserv Dent.* 19(5):455-60.
47. Khadse, P., Banga, A., Kamra, K.S. 2014. Effectiveness of various intermediate irrigants for the prevention of precipitate formed by the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine- An *In Vitro* Study. *Endodontology.* 26(2):309–13.
48. Kishen, A., Chen, N., Tan, L., y Asundi, A. 2004. Chairside Sensor for Rapid Monitoring of *Enterococcus faecalis* Activity. *Journal of Endodontics*, 30(12), 872–875.
49. Kishen, A., George, S., Kumar, R. 2006. *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine *in vitro*. *J Biomed Mater Res A.* 77:406–15.
50. Kishen, C., Sum, S., Mathew y C. Lim. 2008. Influence of irrigation regimens on the adherence of *enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J. Endodon.* 34:7.850– 854.
51. Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Eglund, P.G., Foster, J.S., Palmer, R.J. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3):486-505
52. Krueger, C.D., West, P.M., Sargent, M., Lodolce, A.E., Pickard, A.S. 2007. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *Annals of Pharmacotherapy.* 41;276–284.
53. Kowalski, W.J., Kasper, E.L., Hatton, J.F. 2006. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to particulate dentin. *J Endod.* 32:634–7.
54. Labarta, A.B., Sierra, L.G. 2018. Remoción del barro dentinario al utilizar ácido maleico y EDTA como soluciones irrigantes. *Rev. Cient. Odontol.* 24 (1): 1-14

55. Lappas, M., Permezel, M., Rice, G.E. 2003. N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappa B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:17-23
56. Livingstone, C.R., Andrews, M.A., Jenkins, S.M., Marriott, C. 1990. Model systems for the evaluation of mucolytic drugs: N-acetylcysteine and S-caboxymethylcysteine. *J Pharmacol.* 42:73-8.
57. Lottanti, S., Gautschi, H., Sener, B., Zehnder, M. 2009. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J.* 42:335-43.
58. Macedo, R.G., Wesselink, P.R., Zaccheo, F. Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. *Int Endod J* 2010;43:1108-15.
59. Marchese, A., Bozzolasco, M., Gualco, L., Debbia, E.A., Schito, G.C., Schito, A.M. 2003. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 22:95-100.
60. McComb, D., Smith, D.C. 1975. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod.* 1(7):238-42.
61. McHugh, C.P., Zhang, P., Michalek, S., Eleazer, P.D. 2004. pH required to kill *Enterococcus faecalis in vitro*. *J Endod.* 30:218-9.
62. Di Renzo, T. H., Ellis, E., Sacher y Stangel. 2001. A photoacoustic FTIRS study of the chemical modifications of human dentin surfaces: II. Deproteinization. *Biomaterials.* 22(8):793-797.
63. Migliorati, C.A., Schubert, M.M., Peterson, D.E., Seneda, L.M. 2005. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer.* 1;104(1):83-93
64. Mittal, R., Singla, M.G., Garg, A., Gupta, S., Dahiya, V. 2012. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of MTAD, oxytetracycline, sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: an ex-vivo study. *Saudi Endod J.* 2:70-4.

65. Mohammadi, Z., Abbott, P.V. 2009. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 42(4):288–302.
66. Morago, A., Ordinola-Zapata, R., Ferrer-Luque, C.M., Baca, P., Ruiz-Linares, M., Arias-Moliz, M.T. 2016. Influence of smear layer on the antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigating solution in infected dentin. *J Endod.* 42(11):1647–50.
67. Moon, J., Choi, Y., Lee, H., Heo, J.S., Chang, S.W., Lee, J. 2016. Antibacterial effects of N -acetylcysteine against endodontic pathogens. 54(4):322–9.
68. Moon, J., Jang, E., Shim, K.S., Lee, J. 2015. *In vitro* effects of N -acetyl cysteine alone and in combination with antibiotics on *Prevotella intermedia*. 53(5):321–9.
69. Naenni, N., Thoma, K., Zehnder, M. 2004. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod.* 30:785–7.
70. Nair, P.N., Henry, S., Cano, V., Vera, J. 2005. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99:231–52.
71. Niu, W., Yoshioka, T., Kobayashi, C., Suda, H. 2002. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J.* 35(11):934–9.
72. Noszál, B., Visky, D., Kraszni, M. 2000. Population, acid-base, and redox properties of N-acetylcysteine conformers. *J Med Chem.* 43(11):2176–82
73. Olofsson, A., Hermansson, M., Elwing, H. 2003. N -Acetyl- L -Cysteine affects growth , extracellular polysaccharide production , and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 69(8):4814–22.
74. Orstavik, D., Haapasalo, M. 1990. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 6:142–9.
75. Own, F.M., Badr, S.B., El-Shehaby, F.A., Nada, M.G. 2013. Antimicrobial effect of chlorhexidine and sodium hypochlorite on some microorganisms in the root canals of non-vital teeth in vivo study. *Nat Sci.* 11:26-31.

76. Quah, S.Y., Wu, S., Lui, J.N., Sum, C.B., Tan, K.S. 2012. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. J Endod. 38:81-5.
77. Paque, F., Rechenberg, D., Zehnder, M. 2012. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. J Endod. 38(5):692-5.
78. Quah, S.Y., Wu, S., Lui, J.N., Sum, C.P., Tan, K.S. 2012. N-Acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. J Endod. 38(1):81-5
79. Raghavendra, S.S., Hindlekar, A., Vyavahare, N. 2018. Effect of etidronic acid , chitosan and edta on microhardness of root canal dentin saudi journal of oral and dental research (SJODR). Oral. Dent. Res. (3): 118-121
80. Ricucci, D., Siqueira, J.F. 2010. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod. 36(8):1277-88.
81. Rôças, I.N., Siqueira, J.F., Jr. Santos, K.R. 2004. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J. Endod. 30; 315-320
82. Rôças, I.N., Siqueira, J.F. Jr. 2008. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol 46:3599- 3606.
83. Rossi-Fedele, G., Doramac, E.J., Guastalli, A.R., Steier, L., Poli De Figueiredo, J.A. 2012. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. J Endod. 38(4):426-31.
84. Rotstein, I., Dankner, E., Goldman, A., Heling, I., Stabholz, A., Zalkind, M. 1996. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. J Endod. 22(1):23-6.
85. Russell, R.G., Rogers, M.J. 1999. Bisphosphonates: From the laboratory to the clinic and back again. Bone. 25(1):97-106.
86. Saleh, A.A., Ettman, W.M. 1999. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. J Dent. 27(1):43-6.
87. Sadowska, A.M., Manuel, Y.K., Backer, W.A. 2007. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant *in vitro* and

in vivo dose-effects: a review. *Pulm Pharmacol Ther.* 20:9-22.

88. Sakamoto, M., Siqueira, J.F. Jr., Rôças, I.N., Benno. 2007. Y: Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 22:19.
89. Saleh, A.A., Ettman, W.M. 1999. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. *J Dent.* 27:43–6.9.
90. Sayin, T.C., Cehreli, Z.C., Oflu, H.G. 2007. The effect of EDTA, EGTA, EDTAC, tetracycline-HCl with and with out subsequent NaOCl treatment on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 104:418-24.
91. Scelza, M.F., Teixeira, A.M., Scelza, P. 2003. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% citric acid, and 17% EDTA on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 95(2):234–6.
92. Schäfer, E., Schlingemann, R. 2003. Efficiency of rotary nickel–titanium K3 instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile. Part 2. Cleaning effectiveness and shaping ability in severely curved root canals of extracted teeth. *Int Endod J.* 36(3):208-17
93. Sedgley, C., Nagel, A., Dahlén, G., Reit, C. 2006. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J. Endodon.* 32(3):173–7.
94. Seidberg, B.H., Schilder, H. 1974. An evaluation of EDTA in endodontics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 37:609-20.
95. Sevier, C.S., Kaiser, C.A. 2002. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:836–47.
96. Shen, Y., Stojicic, S., Haapasalo, M. 2011. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.* 37:657–661.
97. Shuping, G.B., Orstavik, D., Sigurdsson, A., Trope, M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 26:751–5.
98. Siqueira, J.F. Jr. 2001. Aetiology of root canal treatment failure: Why well-

treated teeth can fail. *Int. Endod. J.* 34:1-10.

99. Siqueira, J.F. Jr., Rocas, I.N. 2008. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 34:1291–13013.
100. Silveira, L.F., Baca, P., Arias-Moliz, M.T., Rodríguez-Archilla. A., Ferrer-Luque, C.M. 2013. Antimicrobial activity of alexidine alone and associated with N-acetylcysteine against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Int J Oral Surg.* 5:146–149.
101. Sundqvist, G. 1994. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 78(4), 522–530.
102. Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., Sjogren, U. 1998. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 85:86 – 93.
103. Tartari, T., Duarte, A.P., Silva, J.O., Klautau, E.B., Silva, M.H., Silva, E.S. 2013. Etidronate from medicine to endodontics: Effects of different irrigation regimes on root dentin roughness. *J Appl Oral Sci.* 21(5):409–15.
104. Tartari, T., Souza, P., Almeida, B., Júnior, J.O., Facíola, P.O., Silva, M.H. 2013. A new weak chelator in endodontics: Effects of different irrigation regimens with etidronate on root dentin microhardness. *Int J Dent.* (5):743018
105. Tartari, T., Guimaraes, B.M., Amoras, L.S., Duarte, M.A., Silva, E.S., Bramante, C.M. 2014. Etidronate causes minimal changes in the sodium hypochlorite ability to dissolve organic matter. *Int Endod J.* 48(4):399-404.
106. Toker, H., Ozdemir, H., Eren, K., Ozer, H., Sahin, G. 2009. N-Acetylcysteine, a Thiol Antioxidant, Decreases Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol.* 80(4):672-8.
107. Tzanetakis, G.N., Azcarate-Peril, M. A., Zachaki, S., Panopoulos, P., Kontakiotis, E. G., Madianos, P. N., Divaris, K. (2015). Comparison of bacterial community composition of primary and persistent endodontic infections using pyrosequencing. *J. Endodon.* 41(8), 1226–1233.
108. Violich, D.R., Chandler, N.P. 2010. The smear layer in endodontics - A review. *Int Endod J.* 43(1):2–15.

109. Wang, Z., Shen, Y., Haapasalo, M. 2013. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. J Endod. 39(11):1395–400.
110. Yadav, H.K., Tikku, A.P., Chandra, A., Yadav, R.K. 2015. Efficacy of etidronic acid , BioPure MTAD and SmearClear in removing calcium ions from the root canal : An *in vitro* study. Eur J Dent. 9(4):523-528.
111. Yamada, R.S., Armas, A., Goldman, M., Lin, P.S. 1983. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. Journal of Endodontics. 9;137–142.
112. Yang, S.E., Cha, J.H. 2006. Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of *Enterococcus faecalis* to bovine dentin. J Endod. 32:663–7.
113. Zehnder, M., Schmidlin, P., Sener, B., Waltimo, T. 2005. Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod. 31(11):817–20.
114. Zhang, K., Kim, Y.K., Cadenaro, M., Bryan, T.E., Sidow, S.J., Loushine, R.J. 2010. Effects of different exposure times and concentrations of sodium hypochlorite/ethylenediaminetetraacetic acid on the structural integrity of mineralized dentin. J Endod. 36(1):105–9
115. Zhao, T., Liu, Y. 2010. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiology, 10(1); 140.
116. Zehnder, M., Schmidlin, P., Sener, B., Waltimo, T. 2005. Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod. 31:817–20.
117. Zoletti, G. O., Pereira, E. M., Schuenck, R. P., Teixeira, L. M., Siqueira, J. F., y Dos Santos, K. R. N. 2011. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. Res Microbiol. 162(2), 151–158.

XI. Anexos

XI.1 Hoja de recolección de datos

Tabla de niveles de absorbancia óptica obtenida en los 4 grupos al utilizar una densidad óptica de 400 nm y las UFC encontradas en ellas.								
Densidad óptica	400 nm	Agua:	0.063 nm	Control negativo o BHI:	0.930 nm	Cantidad de muestra:	800 µm	
Número de muestra	Solucion salina		N-Acetilcisteína		Etidronato		Hipoclorito de sodio + EDTA	
	Absorbancia	UFC	Absorbancia	UFC	Absorbancia	UFC	Absorbancia	UFC
1	1.278	699,802	1.069	585,359	1.118	612,190	0.948	519,102
2	1.279	700,350	1.107	606,167	1.127	617,118	0.952	521,293
3	1.288	705,278	1.114	610,000	1.135	621,499	0.954	522,388
4	1.359	744,156	1.234	675,709	1.258	688,851	0.968	530,054
5	1.423	779,201	1.328	727,181	1.262	691,041	1.012	554,147
6	1.498	820,269	1.332	729,372	1.302	712,944	1.04	569,479
7	1.563	855,862	1.369	749,632	1.346	737,038	1.086	594,668
8	1.683	921,571	1.402	767,702	1.361	745,251	1.185	648,878
9	1.729	946,759	1.476	808,223	1.382	756,750	1.268	694,327
10	1.821	997,136	1.486	813,698	1.435	785,772	1.283	702,540
11	1.903	1,042,038	1.489	815,341	1.56	854,219	1.29	706,373

12	1.908	1,044, 776	1.553	850,386	1.617	885,431	1.299	711,3 02
13	1.92	1,051, 346	1.676	917,738	1.692	926,499	1.318	721,7 06
14	1.965	1,075, 987	1.768	968,115	1.805	988,375	1.406	769,8 92
15	1.997	1,093, 510	1.895	1,037,6 57	1.974	1,080,916	1.495	818,6 27

Tabla de niveles de absorbancia óptica obtenida en los 4 grupos al utilizar una densidad óptica de 600 nm				
Número de muestra	solución salina	N-Acetilcisteína	Etidronato	Hipoclorito de sodio + EDTA
1	0.391	0.528	0.34	0.225
2	0.836	0.154	0.146	0.114
3	0.531	0.119	0.266	0.113
4	0.638	0.185	0.3	0.12
5	0.451	0.279	0.138	0.109
6	0.496	0.436	0.326	0.158
7	0.746	0.376	0.201	0.174
8	0.238	0.204	0.598	0.43
9	0.605	0.142	0.482	0.114
10	0.422	0.212	0.116	0.118
11	0.171	0.396	0.215	0.104
12	0.317	0.159	0.137	0.079
13	0.209	0.163	0.395	0.081
14	0.173	0.141	0.145	0.093
15	0.196	0.225	0.148	0.079

Tabla de niveles de absorbancia óptica obtenida en los 4 grupos al utilizar una densidad óptica de 800 nm				
Número de muestra	Solución salina	N-Acetilcisteína	Etidronato	Hipoclorito de sodio + EDTA
1	0.263	0.359	0.135	0.175
2	0.704	0.101	0.089	0.073
3	0.339	0.07	0.173	0.071
4	0.49	0.122	0.189	0.076
5	0.343	0.191	0.083	0.067
6	0.328	0.297	0.224	0.099
7	0.578	0.255	0.135	0.09
8	0.146	0.124	0.39	0.199
9	0.39	0.085	0.316	0.076
10	0.296	0.131	0.072	0.078
11	0.144	0.266	0.137	0.064
12	0.213	0.108	0.087	0.06
13	0.133	0.113	0.273	0.06
14	0.111	0.096	0.096	0.069
15	0.119	0.147	0.095	0.059

Tabla de unidades formadoras de colonias obtenida en los cuatro grupos				
Número de muestra	solución salina	N-Acetilcisteína	Etidronato	Hipoclorito de sodio + EDTA
1	699,802	585,359	612,190	519,102
2	700,350	606,167	617,118	521,293
3	705,278	610,000	621,499	522,388
4	744,156	675,709	688,851	530,054
5	779,201	727,181	691,041	554,147
6	820,269	729,372	712,944	569,479
7	855,862	749,632	737,038	594,668
8	921,571	767,702	745,251	648,878

9	946,759	808,223	756,750	694,327
10	997,136	813,698	785,772	702,540
11	1,042,038	815,341	854,219	706,373
12	1,044,776	850,386	885,431	711,302
13	1,051,346	917,738	926,499	721,706
14	1,075,987	968,115	988,375	769,892
15	1,093,510	1,037,657	1,080,916	818,627

Dirección General de Bibliotecas UAQ