



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Medicina
 Especialidad en Endodoncia

Evaluación de la capacidad antibacteriana de los cementos selladores sealapex y pulp canal sealer modificados por la adición de quitosano

Opción de titulación
Tesis

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

Presenta:
 Israel Alejandro Silva Garnica

Dirigido por:
 Dr. en C. Rubén Abraham Domínguez Pérez

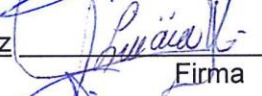
Dr. en C. Rubén Abraham Domínguez Pérez
 Presidente


 Firma

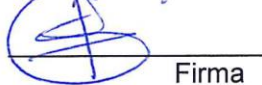
Dra. en C. Rosa Martha Pérez Serrano
 Secretario


 Firma

Dra. en C. María del Socorro Maribel Liñán Fernández
 Vocal



 Firma

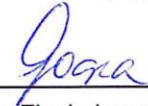
C.D.E.E. Larissa Zavala Vargas
 Suplente


 Firma

C.D.E.E. Daniel De La Rosa Moreno
 Suplente


 Firma


 Dra. Ma. Guadalupe Zaldivar Lelo de Larrea
 Director de la Facultad


 Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
 Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Introducción: El objetivo del tratamiento de conductos es eliminar la mayor cantidad posible de bacterias. Si las bacterias son removidas a niveles que son indetectables habrá una tasa de éxito extremadamente alta. Muchos estudios han evaluado los efectos antibacterianos de selladores endodónticos, la mala acción de un sellador endodóntico puede tener muchos efectos diferentes, tales como la prolongación de la inflamación y la infección. Por lo que el propósito de este estudio fue evaluar los cambios de la actividad antibacteriana de los selladores Seal ápex y Pulp canal sealer agregando quitosano a su composición. **Objetivo:** Determinar cuál cemento sellador (sealapex o pulp canal sealer) presenta una mayor actividad antibacteriana contra *E. faecalis* cuando se le adiciona quitosano **Métodos:** Todos los procedimientos se realizaron dentro de una campana de bioseguridad. Se utilizaron los cementos selladores Pulp canal sealer y Seal ápex según las indicaciones del fabricante. En la prueba de ADT se utilizaron placas Petri con Agar para el sembrado de *E. faecalis*, en la cuales se colocaron varios grupos experimentales de cementos selladores con diferentes concentraciones de quitosano para determinar su área de inhibición. En la prueba de DCT se utilizó una placa de 24 pozos para la colocación de caldo contaminado con *E. faecalis* donde se colocó en cada pozo una concentración diferente del quitosano con el cemento sellador y con ayuda de un espectrofotómetro se midió el crecimiento bacteriano. **Resultados:** En el grupo control y en el grupo con 1 ul de quitosano observamos que no había una diferencia significativa, sin embargo, en los grupos con mayor concentración de quitosano, 5 ul y 10 ul se pudo observar un aumento en su actividad antibacteriana. Ambos cementos mostraron actividad antimicrobiana al aumentar la concentración de quitosano. **Conclusiones:** Los grupos experimentales con 5 ul y 10 ul de quitosano mostraron una diferencia significativa en su actividad antibacteriana. El Pulp canal sealer es el cemento que presentó una mayor actividad antibacteriana. En ambos cementos selladores en combinación con quitosano mostraron su índice más alto de actividad antibacteriana a las 24 horas.

(**Palabras clave:** endodoncia, capacidad antibacteriana, Seal ápex, Pulp canal sealer, quitosano)

ABSTRACT

Introduction: The goal of endodontic treatment is to eliminate as many bacteria as possible. If the bacteria are removed at levels that are undetectable there will be an extremely high success rate. Many studies have evaluated the antibacterial effects of endodontic sealers; the bad action of an endodontic sealer can have many different effects, such as the prolongation of inflammation and infection. Therefore, the purpose of this study was to evaluate changes in the antibacterial activity of Seal apex and Pulp canal sealer sealants by adding chitosan to their composition. **Objective:** To determine which sealant cement (sealapex or pulp canal sealer) has a greater antibacterial activity against *E. faecalis* when chitosan is added. **Methods:** All procedures were performed within a biosafety campaign. The sealant cements Pulp canal sealer and Seal apex were used according to the manufacturer's instructions. In the ADT test, Petri dishes with Agar were used for the seeding of *E. faecalis*, in which several experimental groups of sealing cements with different concentrations of chitosan were placed to determine their area of inhibition. In the DCT test, a 24-well plate was used to place broth contaminated with *E. faecalis*, where a different concentration of chitosan was placed in each well with the cement sealer and bacterial growth was measured with a spectrophotometer. **Results:** In the control group and in the group with 1 ul of chitosan we observed that there was no significant difference, however, in the groups with the highest concentration of chitosan, 5 ul and 10 ul, an increase in their antibacterial activity could be observed. Both cements showed antimicrobial activity by increasing the concentration of chitosan. **Conclusions:** The experimental groups with 5 ul and 10 ul of chitosan showed a significant difference in their antibacterial activity. The Pulp canal sealer is the cement that showed the highest antibacterial activity. In both sealant cements in combination with chitosan they showed their highest rate of antibacterial activity at 24 hours.

(Key words: endodontics, antibacterial capacity, Seal apex, Pulp canal sealer, chitosan)

DEDICATORIAS

A mis padres Alejandro Silva y Patricia Garnica por todo su esfuerzo en mi educación. A mi hermana Abril Silva por siempre estar presente en cada momento de dificultad. Y finalmente a mis amigos que siempre serán mi segunda familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres y a mi hermana por haberme apoyado en todos los aspectos a lo largo de estos 2 años, por darme su confianza, siendo ellos mi pilar más grande.

A mis maestros de la especialidad por brindarme sus conocimientos de manera incondicional, ayudarme a volverme un mejor profesionalista día con día.

Al Dr. Rubén Domínguez por su apoyo como asesor, maestro y amigo, brindando su experiencia, paciencia y buena voluntad todos los días.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme la beca para culminar mi especialidad, así como para impulsar la investigación y conocimientos científicos dentro de este país.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	
1.1 Revisión de la literatura.....	8
1.2 Planteamiento del problema.....	15
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 METODOLOGIA	
3.1 Sujeto experimental	17
3.2 Métodos	17
3.3 Análisis estadístico	26
4 Resultados y Discusión	
4.1 Resultados.....	27
4.2 Discusión	30
4.3 Conclusión.....	34
5 REFERENCIAS.....	35
6 APENDICE	

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Comparación del área de inhibición en milímetros cuadrados de los selladores Pulp canal sealer y Seal apex en cajas Petri con E. faecalis

TABLA 2. Comparación de la absorbancia registrada en medios de cultivo inoculados con E. faecalis y expuestos a los selladores Pulp canal sealer y Seal apex

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Comparación del área de inhibición de los selladores Pulp canal sealer y Seal apex

FIGURA 2. Comparación de la absorbancia de los selladores Pulp canal sealer y Seal apex

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Revisión de la literatura

El objetivo del tratamiento de conducto radicular es reducir la infección en el conducto radicular a un nivel mínimo y lograr la ausencia de periodontitis apical post-tratamiento. Aunque los factores químicos y físicos pueden inducir la inflamación perirradicular, la evidencia abrumadora indica que los agentes microbianos son esenciales para la progresión y perpetuación de las enfermedades inflamatorias perirradiculares. La periodontitis apical puede presentarse antes y después del tratamiento del conducto radicular. Los dientes con periodontitis apical pueden ser sintomáticos o asintomáticos, funcionales o no funcionales. (Kakehashi et al., 1965; Möller, 1966; Möller et al., 1981; Byström et al., 1987; Ørstavik y Pitt Ford, 1998; Friedman, 2002; Trope, 2003; Wu et al., 2006).

Eliminar la mayor cantidad posible de bacterias siempre será el objetivo principal. Si las bacterias son removidas a niveles que son indetectables, se puede esperar una tasa de éxito extremadamente alta en la resolución de periodontitis apical. (Byström et al., 1987; Sjögren et al., 1997).

La periodontitis apical es causada, principalmente, por bacterias en el espacio del conducto radicular. La clave para un tratamiento endodóntico exitoso es desbridar completamente el sistema de conductos de tejido pulpar infectado o necrótico y microorganismos, y sellar completamente el espacio del conducto, evitando así la persistencia de la infección y / o reinfección de la cavidad pulpar. (Engstrom, 1964; Kakehashi et al., 1965; Sunclqvist, 1976).

El estudio de los biofilms microbianos asume una gran importancia en diferentes sectores de la microbiología industrial, ambiental y médica. En la microbiología médica, los biofilms han sido estudiadas cada vez más y las estimaciones indican que las infecciones de biofilm comprenden del 65% al 80% de las infecciones humanas en el mundo desarrollado. Una evidencia creciente indica que la

periodontitis apical es también una enfermedad inducida por biofilm. (Costerton, 2004; Svensäter y Bergenholtz, 2004; De Paz, 2007; Siqueira y Rôças, 2009).

La naturaleza de una biopelícula o biofilm encontrado dentro de los conductos radiculares será con la colonización de uno o varios microorganismos que forman comunidades tridimensionales con canales de fluido para el transporte de sustratos, desechos y moléculas de señal, estos se caracterizarán por encontrarse adheridos a la superficie de dentina, estableciéndose después de la primera invasión a cámara pulpar; su misma estructura proporciona una protección efectiva contra el huésped y elementos antibacterianos. (Jhajharia et al., 2015; Siqueira, 2001).

A pesar de que el concepto de periodontitis apical como enfermedad inducida por biofilm, la prevalencia de biofilms y su asociación con hallazgos clínicos e histopatológicos aún no se han reportado. Antes de que esta información sea disponible, puede parecer algo impreciso generalizar y clasificar la periodontitis apical como una enfermedad inducida por biofilm. (Costerton, 2004)

Para contrarrestar este entorno, se ha propuesto el uso de cementos selladores endodónticos ya que brindan las funciones de aislar a microorganismos y a sus productos de los tejidos periradiculares después de la etapa de obturación, además presentan propiedades antimicrobianas, capaces de compensar las limitaciones de la limpieza biomecánica (Matsuo et al., 2003; Siren et al., 1997).

Dentro de los cementos selladores, encontramos diversos tipos dependiendo de sus componentes químicos, entre ellos podemos encontrar; Sealapex® es un sellador radicular de polímero de hidróxido de calcio sin eugenol. Su fórmula promueve una rápida cicatrización y formación de tejido duro. Las ventajas de los cementos a base de hidróxido de calcio incluyen su plasticidad, tiempo de trabajo extendido en ausencia de humedad y buen potencial de sellado. La principal desventaja, es su descomposición por el agua, lo que los hace materiales débiles e inestables. Tienen un tiempo de trabajo prolongado, pero se fijan más rápido en el diente que en la

loseta de vidrio debido al aumento de la temperatura corporal y la humedad. (Ingle et al., 1982).

Pulp Canal Sealer™ es un sellador de óxido de zinc con eugenol que tiene una base en polvo y un catalizador líquido. Tiene un potencial citotóxico e irritante para los tejidos, sobre células del ligamento periodontal humano y sobre los osteoblastos. Los selladores de óxido de zinc de tipo eugenol son irritantes principalmente debido al eugenol. El eugenol y otros ingredientes pueden modular la respuesta inmune y contribuir a la inflamación periapical y al dolor. (Geurtsen, 2001; Suresh y Gopikrishna, 2014).

Dentro del conducto podemos encontrar diferentes tipos de bacterias; las bacterias anaerobias, especialmente los Gram negativos, se han relacionado con los signos y síntomas de la enfermedad endodóntica. Pero las bacterias facultativas, como *Enterococcus faecalis*, también han sido aisladas de los canales radiculares patológicamente involucrados, siendo considerada una de las especies más resistentes en la cavidad oral y una posible causa de fracaso en el tratamiento del conducto radicular (Gomes et al., 1996).

El *Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram positiva la cual se caracteriza por su capacidad de sobrevivir largos periodos con pocos nutrientes, así como por su gran penetración en los tubulillos dentinarios, además tiene buena adaptación a cambios de su entorno (cuando estos se tornan alcalinos), haciendo que su completa eliminación sea complicada y sea considerada como una de las especies más resistentes de la cavidad oral, por eso es que ha sido utilizado como un estándar en la investigación de las propiedades antibacterianas de los materiales endodónticos (Kayaoglu, 2004).

Se han descrito que algunas cepas de enterococos son resistentes a múltiples antibióticos como bencilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol y tetraciclina; algunos otros han descubierto cepas que son resistentes a las

cefalosporinas; además de informes sobre resistencias a aminoglucósidos, eritromicina, cloranfenicol, y más recientemente, a la vancomicina (Pinheiro et al., 2004).

El E. faecalis está asociado con diferentes enfermedades periapicales incluyendo la infección primaria e infecciones persistentes. Dentro de la infección primaria está asociado más frecuentemente con lesiones periapicales crónicas asintomáticas que en periodontitis apical aguda o en absceso periapical agudo. Se encuentra en el 40% de las infecciones primarias endodónticas y su frecuencia en lesiones periapicales persistentes es más alta. De hecho, se ha encontrado hasta nueve veces más *E. faecalis* en los tratamientos de conductos fracasados que en la infección primaria. (Phineiro et al., 2003).

Por tal motivo se propone llegar a calibres grandes en cuanto instrumentación se refiere, logrando eliminar físicamente a las bacterias intratubulares o aumentando la apertura de túbulos, permitiendo la entrada más efectiva de agentes antimicrobianos; el uso de la clorhexidina al 2%, ácido cítrico, EDTA y cementos selladores con pH alcalino han sido sugerencias importantes para contrarrestarlo, sin embargo se habla que su erradicación total aun es controversial, poniendo como final opción abordaje quirúrgico y obturación retrograda (Stuart et al., 2006).

Mientras que, en las enfermedades periodontales, los investigadores deben distinguir los patógenos dentro de una microbiota normal, en las infecciones endodónticas este problema no existe, porque el sistema radicular no posee una microbiota normal. Mientras la pulpa es vital, es un tejido estéril como cualquier tejido conectivo en otra parte del cuerpo. La infección se produce sólo después de la necrosis pulpar. Teóricamente, cualquier especie microbiana que colonice la pulpa necrótica podría participar en la patogénesis de las enfermedades perirradiculares. Sin embargo, parece que no todas las especies presentes en las infecciones endodónticas son capaces de causar enfermedad (Sundqvist et al.,

1979; Dahlén et al., 1982; Fabricius et al., 1982; Baumgartner et al., 1992; Siqueira et al., 1998).

Muchos estudios han evaluado los efectos antibacterianos de selladores endodónticos y pastas utilizando microorganismos anaeróbicos facultativos o estrictos, que fueron Gram-positivos o Gram-negativos o cocos. (Weiss et al., 1996; Siqueira y de Uzeda, 1997).

La obtención de un sello hermético es, junto con la limpieza y configuración del conducto radicular, una de las claves para lograr un tratamiento endodóntico exitoso a largo plazo. En la práctica clínica, los dientes que tienen una afectación pulpar o periapical severa se tratan endodónticamente limpiando y conformando el conducto radicular, luego la obturación total de ese espacio, particularmente el foramen. Por lo tanto, un objetivo principal de la endodoncia operativa es desarrollar un sello hermético a los fluidos en el agujero apical. Un sellado hermético no puede obtenerse sin el uso de un sellador, porque la gutapercha no se une espontáneamente a las paredes de la dentina. Un sellador endodóntico ideal debe, en parte, adherirse firmemente tanto a la dentina como a la gutapercha. Se pueden esperar diferencias en las propiedades adhesivas de los selladores endodónticos, porque su interacción con la dentina o la gutapercha puede variar con su composición química. (Angmar-Månsson et al., 1969; Skinner y Himel, 1987; Weiger et al., 1995; Schilder, 2006).

La mala acción de sellado con un sellador endodóntico puede tener muchos efectos diferentes, tales como la prolongación de la inflamación y la infección, la falta de resolución de lesiones periapicales y posiblemente la fractura de las raíces del diente. La investigación sobre los cementos selladores endodónticos se puede clasificar de acuerdo a tres amplias áreas: histológica, sellante y propiedades físicas. (Angmar-Månsson et al., 1969; Rud y Omnell, 1970).

Ha habido muchos estudios que han reportado las propiedades físicas de selladores endodónticos, tales como resistencia a compresión, sorción y solubilidad de agua, propiedades reológicas, cambio dimensional, tamaño de partícula, tiempo de fraguado, pH, radiopacidad y grosor de película. El sellador realiza varias funciones durante la obturación de un sistema radicular con gutapercha: lubriza y ayuda al asentamiento del cono maestro de gutapercha, actúa como agente aglutinante entre la gutapercha y el canal Pared y llena espacios anatómicos que el material de relleno principal no ha podido alcanzar. (McComb & Smith 1976; Ørstavik et al., 1987).

Las propiedades de manipulación de los selladores de conducto radicular y su comportamiento clínico pueden caracterizarse por pruebas de laboratorio sobre sus propiedades físicas. Estos incluyen flujo, solubilidad, tiempos de trabajo y de fraguado. Estos materiales requieren tiempo de trabajo adecuado para el manejo clínico. Dentro del conducto radicular, sus propiedades de flujo determinan la eficacia con la que se pueden obturar los conductos accesorios y los huecos entre los conos maestros y accesorios (Tagger y Tagger, 1989; Kontakiotis et al., 1995)

La actividad antimicrobiana de los materiales endodónticos puede evaluarse in vitro o in vivo. La difusión del agar, a pesar de las limitaciones, como la falta de estandarización de la densidad del inóculo, el medio de cultivo adecuado, la viscosidad del agar, las condiciones de almacenamiento de la placa, el tamaño y número de especímenes por placa y el tiempo y la temperatura de incubación sigue siendo el método in vitro más utilizado; en la evaluación de la actividad antimicrobiana. (Weiss et al., 1996)

Es un estudio de susceptibilidad, de difusión en agar. Un disco que tiene una cantidad específica (no concentración) de antimicrobiano, es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano.

Esta metodología se encuentra estandarizada para el estudio de *Enterobacteriaceas*, *Pseudomonas aeruginosas* y *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio cholerae*. (Weiss et al., 1996)

Otro estudio que se utiliza para medir la actividad antibacteriana es la prueba DCT, que se basa en medir el efecto del contacto cercano entre las bacterias y el material analizado en la cinética del crecimiento bacteriano utilizando un espectrofotómetro de microplacas de temperatura controlada. (Weiss et al., 1996)

Dentro de las características que debe poseer un cemento sellador ideal, es una buena actividad antibacteriana. Por esa razón en estudios recientes, los investigadores han buscado la forma de mejorar la actividad antibacteriana de los cementos selladores, inclusive modificando su estructura química. Entre los materiales que se han utilizado para modificar los cementos endodónticos, encontramos el quitosano que es un biopolímero catiónico no tóxico que posee propiedades antibacterianas duraderas. Las nanopartículas pueden difundirse potencialmente del sellador y penetrar en los túbulos dentinarios y las complejidades anatómicas. Además de la capacidad del quitosano de ser incorporado en selladores, la estructura química del quitosano también permite la preparación de numerosos derivados que se pueden usar para el tratamiento superficial de los canales. (Bernkop-Schnürch, 2000; Shrestha et al., 2010).

Se propusieron varios tratamientos basados con quitosano para eliminar las bacterias restantes después del riego, promover la remineralización de la dentina y aumentar la resistencia a la degradación del colágeno. La inmovilización de quitosano fosforilado en el colágeno dentinario se propuso para inducir la remineralización de la dentina desmineralizada, ya que sus grupos fosfato puede unirse a los iones de calcio para formar una superficie favorable para la nucleación de cristales. En consecuencia, estos sitios de nucleación inducirían la formación de

una capa de fosfato de calcio sobre la dentina. (Xu et al., 2011; Shrestha et al., 2012).

Estudios anteriores han demostrado que el efecto antibacteriano del sellador de óxido de zinc-eugenol (ZOE) se potenció mediante la adición de nanopartículas de quitosano (CNps). De manera similar, la adición de CNps a un sellador a base de metacrilato también dio como resultado una alta actividad antibacteriana sin comprometer su fuerza de adhesión. Aunque el quitosano ha atraído gran interés en la regeneración de tejidos, tiene una bioactividad insignificante para aplicaciones dentales, principalmente debido a la falta de capacidad quelante de ion calcio, lo cual es crucial para la formación de HAP. (Muzzarelli et al., 1998; Di Martino et al., 2005; Kayaoglu et al., 2005; Kishen et al., 2008; DaSilva et al., 2013).

1.2 Planteamiento del problema

Una vez que se ha realizado el tratamiento endodóntico, llegan a surgir situaciones como las infecciones persistentes, en las que encontramos bacterias en los conductos, lo que puede provocar una reagudización en los tejidos periapicales y por consiguiente el fracaso del tratamiento. Teniendo en cuenta esto, es importante buscar el cemento sellador con mejor capacidad antimicrobiana. Se ha buscado potenciar la actividad antimicrobiana de los cementos selladores agregando a su composición diversos productos, uno de ellos es el quitosano, sin embargo, no se sabe si agregarlo potenciara el efecto antibacteriano de los cementos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar cuál cemento sellador (sealapex o pulp canal sealer) presenta una mayor actividad antibacteriana contra *E. faecalis* cuando se le adiciona quitosano

2.2 Objetivos específicos

- 1 Evaluar la actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* del cemento sellador sealapex con adición de quitosano.
- 2 Evaluar la actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* del cemento sellador pulp canal sealer con adición de quitosano.
- 3 Comparar la actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* de los cementos selladores con adición de quitosano.

3. METODOLOGIA

3.1 Sujeto experimental

Durante esta investigación todos los procesos fueron desarrollados en el Laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinaria de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Todos los procedimientos se realizaron dentro de una campana de bioseguridad, con el fin de trabajar con la cepa de *Enterococcus faecalis*.

Se utilizaron los cementos selladores Pulp canal sealer y Seal apex según las indicaciones del fabricante. También se trabajó con el quitosano, el cual se fabricó en el laboratorio de investigación.

3.2 Métodos

Preparación de quitosano

- 1.- Se pesaron 30 mg de quitosano y se colocaron en un tubo falcom con 30 ml de ácido acético glacial.
- 2.- Se mezcló y se dejó reposar por 24 horas
- 3.- Se agregó una solución de NaOH hasta que el pH fue mayor a 8
- 4.- Se colocó en el Vortex durante 5 min
- 5.- Se prosiguió a Centrifugar durante 5 min a 5000 rpm
- 6.- Se tiro el sobrante
- 7.- Se lavo el precipitado con alcohol 70/30
- 8.- Se colocó para Centrifugar durante 5 min a 5000 rpm
- 9.- Se tiro el liquido
- 10.- Se dejo secar
- 11.- Se pesó el líquido liofilizado
- 12.- Se comenzó a agregar la solución de ácido acético poco a poco y se registró. (se colocó lo menos posible de líquido de ácido acético para disolverlo).

Se realizaron 2 tipos de ensayos, para evaluar la capacidad antimicrobiana de los cementos selladores, prueba de difusión de agar y prueba de contacto directo.

Prueba de difusión en Agar (ADT)

Preparación de placas de agar

1.- Se tomo el BD Difco™ Brain Heart infusion Agar y se pesó hasta conseguir 26 gramos. Figura 1.

2.- Se tomo el agua destilada y se midió según las especificaciones del fabricante BD Difco™. Figura 2.

3.- Se prosiguió a mezclar el agar con el agua en un matraz Erlenmeyer de una forma uniforme, sin presencia de grumos. Figura 3.

4.- Se tapo el matraz con papel aluminio y se colocó en el autoclave a una temperatura de 125° C durante 30 minutos, para lograr una esterilización de forma correcta. Figura 4.

5.- Después de que termino el ciclo de esterilización, se dejó reposar el matraz para que bajara su temperatura, sin esperar mucho tiempo ya que podía endurecer. Figura 5.

6.- Una vez que se consiguió la temperatura correcta, se vertió la mezcla sobre las cajas Petri. Figura 6.

7.- Ya que se finalizó el proceso, se dejaron secar las cajas Petri cerca de los mecheros, para evitar su contaminación. Figura 7.

8.- Cuando las cajas Petri se encontraron completamente secas, se almacenaron en la incubadora por 1 día.



Figura 1.

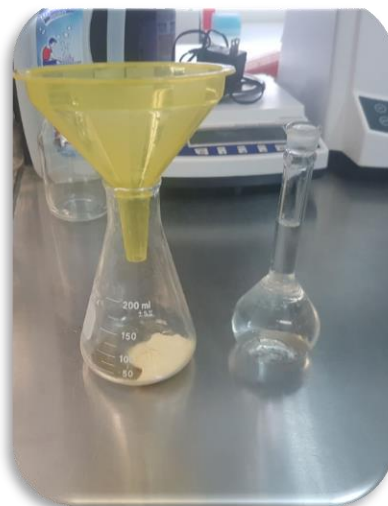


Figura 2.



Figura 3.



Figura 4.



Figura 5.



Figura 6.



Figura 7.

Preparación del cultivo inicial estandar

- 1.- Primero se tomó el tubo de cultivo PYREX® con el *E. faecalis* de la gradilla para tubos, para realizar los pases. Figura 8
- 2.- Colocamos la micropipeta, las puntas de micropipeta y el tubo de cultivo con la cepa de *E. faecalis* cerca de los mecheros para evitar la contaminación. Figura 9.
- 3.- Se abrió la tapa del tubo de cultivo, la tapa se pasó cerca de la flama del mechero, al igual que la boca del tubo.
- 4.- Se tomo 1 ml de *E. faecalis* y se colocó dentro de 1 tubo de cultivo que ya tenía 9 ml de caldo estéril. Figura 9.

5.- Antes de cerrar los tubos de cultivo, las tapas y las bocas de los tubos se volvieron a pasar por la flama del mechero. Figura 10.

6.- Los tubos de cultivo se colocaron en la gradilla para tubos y se mantuvo en la incubadora por 1 día, para garantizar el crecimiento del *E. faecalis*.

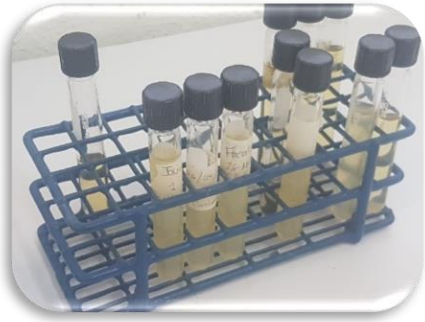


Figura 8.

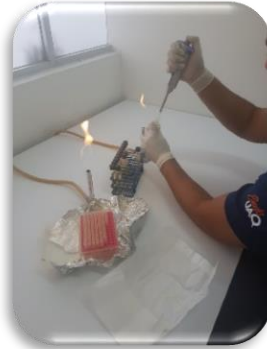


Figura 9.



Figura 10.

Siembra en las placas por agotamiento

1.- Después de mantener 1 día las cajas Petri en la incubadora, se sacaron para iniciar el proceso de sembrado.

2.- Se retiró la gradilla para tubos de la incubadora y se tomó el tubo para muestra con el *E. Faecalis*.

3.- Se colocaron las cajas Petri y la gradilla para tubos lo más cerca posible de los mecheros para evitar su contaminación.

4.- Se abrió la caja Petri con la que iniciamos nuestro sembrado, sin que la tapa tocara ninguna superficie.

5.- Se abrió el tubo para muestra con la cepa de *E. faecalis* y se pasó la boca del tubo y la tapa por la flama del mechero.

6.- Se tomó un hisopo estéril y se introdujo en el tubo con la cepa de *E. faecalis*, hasta que se logró empapar.

7.- Se eliminó el excedente del hisopo antes de retirarlo del tubo de muestra.

8.- Se tomó la tapa del tubo y se pasó por la flama del mechero al igual que la boca del tubo.

9.- El hisopo se froto sobre las cajas de agar hasta cubrir la totalidad de la superficie.
Figura 11.



Figura 11.

Colocación de los cemento con y sin quitosano en placas de agar

1.- Se colocó .5009 gr de polvo de pulp canal sealer y 4 gotas para el grupo control en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a la caja Petri hasta conseguir un círculo uniforme.

2.- Para el grupo experimental de 1 ul de quitosano, se colocó .5009 gr de polvo de pulp canal sealer y 4 gotas más 1 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a la caja Petri hasta conseguir un círculo uniforme.

3.- Para el grupo experimental de 5 ul de quitosano, se colocó .5009 gr de polvo de pulp canal sealer y 4 gotas más 5 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a la caja Petri hasta conseguir un círculo uniforme.

4.- Para el grupo experimental de 10 ul de quitosano, se colocó .5009 gr de polvo de pulp canal sealer y 4 gotas más 10 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a la caja Petri hasta conseguir un círculo uniforme.

5.- En la colocación de los 4 grupos, se ordenaron de tal forma de que solo ocuparan la mitad de la caja Petri para poder utilizar la otra mitad con el cemento sellador sealapex.

6.- Se colocó .325 gr. de base y .325 gr. de catalizador para el grupo control en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a la caja Petri hasta conseguir un círculo uniforme. Figura 12.

7.- Para el grupo experimental de 1 ul de quitosano, Se colocó .325 gr. de base y .325 gr. de catalizador más 1 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a la caja Petri hasta conseguir un círculo uniforme. Figura 13.

8.- Para el grupo experimental de 5 ul de quitosano, Se colocó .325 gr. de base y .325 gr. de catalizador más 5 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a la caja Petri hasta conseguir un círculo uniforme. Figura 14.

9.- Para el grupo experimental de 10 ul de quitosano, Se colocó .325 gr. de base y .325 gr. de catalizador más 10 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a la caja Petri hasta conseguir un círculo uniforme. Figura 16.

10.- Una vez que se terminó con la colocación de los cementos selladores en las cajas Petri, se dejaron secar cerca de los mecheros, se colocó su tapa y

NOTA: A mayor concentración de quitosano se volvió más complicado la manipulación del cemento. El cemento que tuvo la manipulación más complicada fue el Pulp canal sealer

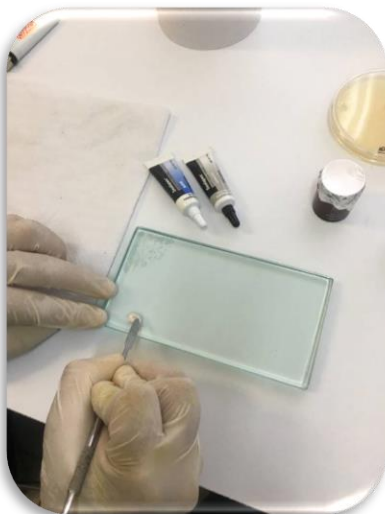


Figura 12.

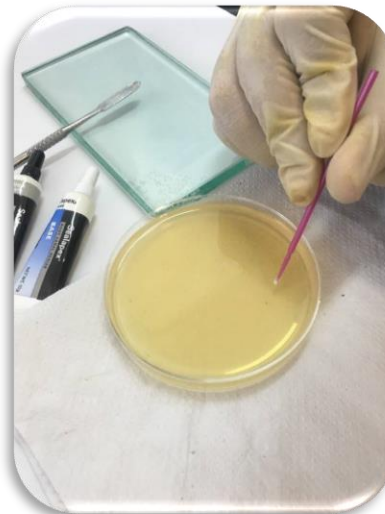


Figura 13.

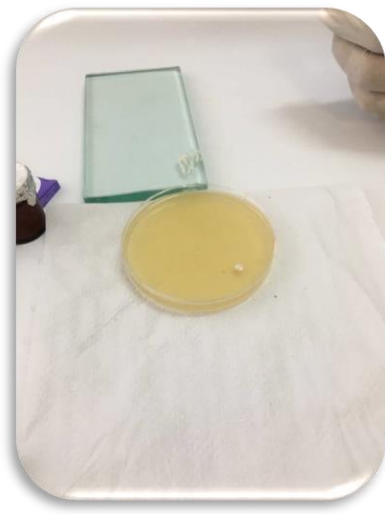


Figura 14.



Figura 15.



Figura 16.

Toma de fotografía y medición

1.- Una vez que cumplieron 24 horas en la incubadora, las placas Petri se retiraron para la toma de fotografías. Figura 17

2.- Cada caja Petri se colocó en un fondo negro con una regla milimétrica como punto de referencia y se le tomo una foto. Figura 18

3.- Una vez que se tuvieron las fotos, estas se procesaron con el programa ImageJ para determinar el área de inhibición. Figura 19

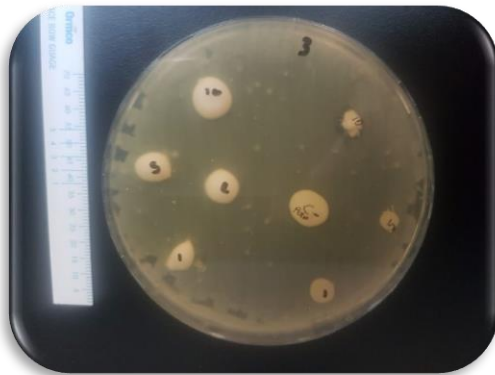


Figura 17

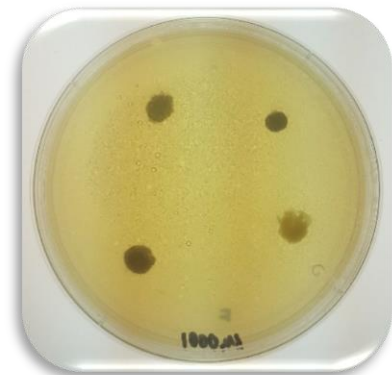


Figura 18

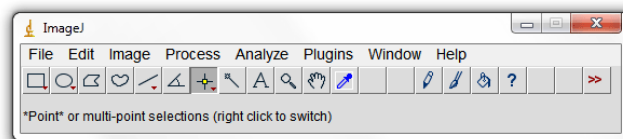


Figura 19

Prueba de Contacto directo (DCT)

Preparación y colocación de cementos

1.- Se colocó .5009 gr de polvo de pulp canal sealer y 4 gotas, más 1 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a un pozo de una placa de microtitulación de 24 pocillos, para que cubriera la superficie inferior de forma uniforme

2.- Se colocó .5009 gr de polvo de pulp canal sealer y 4 gotas, más 5 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a un pozo de una placa de microtitulación de 24 pocillos, para que cubriera la superficie inferior de forma uniforme.

3.- Se colocó .5009 gr de polvo de pulp canal sealer y 4 gotas, más 10 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a un pozo de una placa de microtitulación de 24 pocillos, para que cubriera la superficie inferior de forma uniforme.

4.- Se colocó .5009 gr de polvo de pulp canal sealer y 4 gotas, sin quitosano en una loseta estéril para el grupo control negativo, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a un pozo de una placa de microtitulación de 24 pocillos, para que cubriera la superficie inferior de forma uniforme.

5.- Como grupo control positivo, no se colocó cemento sellador y se dejó sin material uno de los pozos.

6.- Se colocó .325 gr. de base y .325 gr. de catalizador más 1 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a un pozo de una placa de microtitulación de 24 pocillos, para que cubriera la superficie inferior de forma uniforme

7.- Se colocó .325 gr. de base y .325 gr. de catalizador más 5 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a un pozo para de una placa de microtitulación de 24 pocillos, que cubriera la superficie inferior de forma uniforme

8.- Se colocó .325 gr. de base y .325 gr. de catalizador más 10 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a un pozo de una placa de microtitulación de 24 pocillos, para que cubriera la superficie inferior de forma uniforme.

9.- Se colocó .325 gr. de base y .325 gr. de catalizador sin quitosano en una loseta estéril para el grupo control negativo, se mezclaron con una espátula estéril y con la ayuda de un microbrush se trasladó la mezcla a un pozo de una placa de

microtitulación de 24 pocillos, para que cubriera la superficie inferior de forma uniforme.

10.- Como grupo control positivo, no se colocó cemento sellador y se dejó solo el caldo contaminado con *E. faecalis*.

Esterilización del la placa con los cementos

1.- Después de terminar de colocar los cementos selladores y el caldo contaminado, tapamos la placa. Figura 17

2.- Para esterilizar la placa de microtitulación, se colocó en el The Accuris™ UV Transilluminator, donde se sometio a 2 ciclos de 5 minutos a luz ultravioleta. Figura 18

3.- Después de terminar los ciclos, se le agrego a cada una 3ml de medio de cultivo BHI contaminado con una cantidad estandarizada de *E. faecalis* y se colocó la placa en la incubadora durante 24 horas

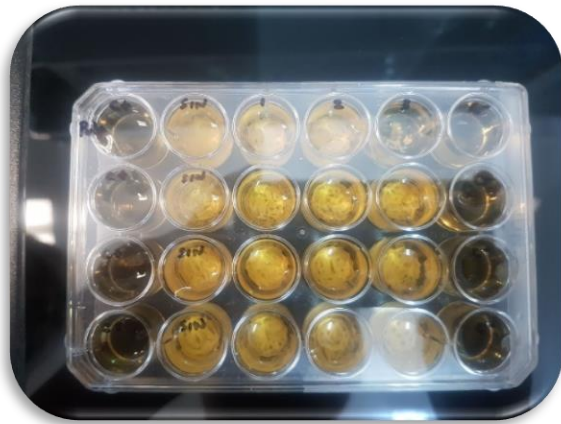


Figura 17

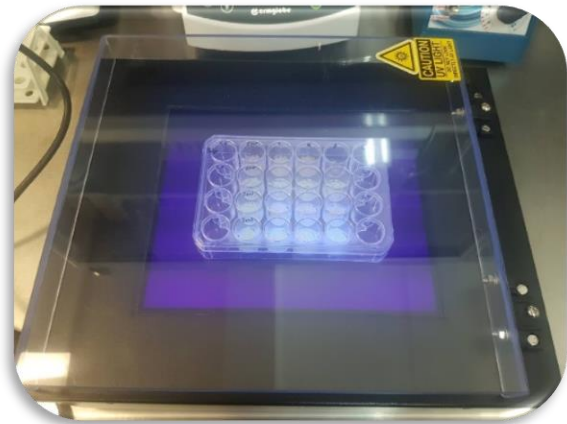


Figura 18

Proceso de observación y medición

1.- Una vez que terminaron las 24 horas, se retiró la placa de la incubadora y se observó el crecimiento bacteriano. Figura 19, Figura 20.

2.- El siguiente paso fue someter la placa a la prueba de la absorbancia en un

espectrofotómetro, para medir cual era el camino óptico menos denso y determinar el crecimiento bacteriano.

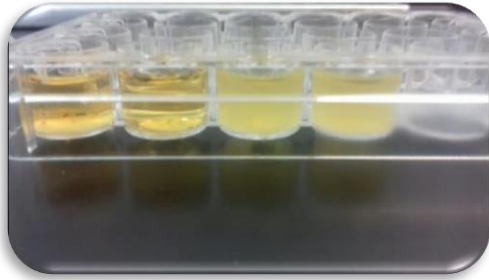


Figura 19

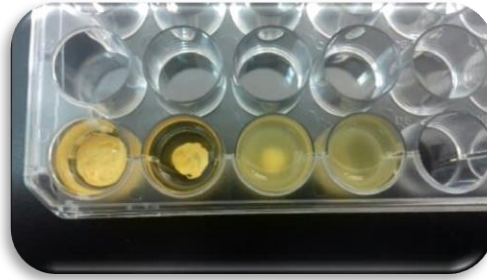


Figura 20

3.3 Análisis estadístico

Para conocer la actividad antimicrobiana de los grupos experimentales, con diferentes concentraciones de quitosano (cementos selladores Sealpaex y Pulp canal sealer), se realizó una prueba de ANOVA para investigar las posibles diferencias entre las medias de grupos, Para determinar si hubo diferencias entre dos grupos se utilizó la prueba t de student, análisis que fue complementado mediante la prueba Post hoc de tuckey. Los datos cuantitativos están expresados en media, desviación estándar y rango. El análisis fue realizado con el software estadístico Graph path Prism.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Se realizó la evaluación de la capacidad antibacteriana de 2 cementos selladores endodónticos, Seal apex y Pulp canal sealer. Mediante las pruebas de ADT y DCT, utilizando cementos selladores con diferentes concentraciones de quitosano, con 1 ul, 5 ul y 10 ul.

En la tabla 1 se muestra la comparación del área de inhibición en milímetros cuadrados de ambos selladores con las diferentes concentraciones de quitosano añadidas y los grupos experimentales. Realizadas en cajas Petri en donde se sembró previamente *E. faecalis*. En un periodo de exposición de 24 horas.

Tabla 1. Comparación del área de inhibición en milímetros cuadrados de los selladores Pulp canal sealer y Seal ápex en cajas Petri con *E. faecalis*

	Sin Quitosano (n=5)	Quitosano 1 ul (n=5)	Quitosano 5 ul (n=5)	Quitosano 10 ul (n=5)	Valor de p*
			X ± D.E. (Rango)		
Seal Apex	0	0	0.0516 ± 0.0086 (0.061 - 0.042)	0.0864 ± 0.0087 (0.099 - 0.079)	<0.0001
PulpCanal Sealer	0	0	0.095 ± 0.0078 (0.105 - 0.086)	0.2836 ± 0.0450 (0.344 - 0.243)	<0.0001
Valor de p**			<0.0001	<0.0001	

X: Media; D.E: Desviación estándar. * ANOVA pos hoc de Tukey. ** t de student.

Es importante mencionar que en el grupo control, como en el grupo con la menor concentración de quitosano de ambos cementos, no se presentó área de inhibición lo que indica que el material por sí solo y el material con la menor concentración de quitosano no tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del *E. faecalis*.

En los grupos de 5 μ l y 10 μ l se pudo registrar un área de inhibición, siendo el grupo de 10 μ l el que presentó la mayor. El cemento Pulp canal sealer presentó una mayor actividad antibacteriana al presentar los halos de inhibición más grandes, figura 1.

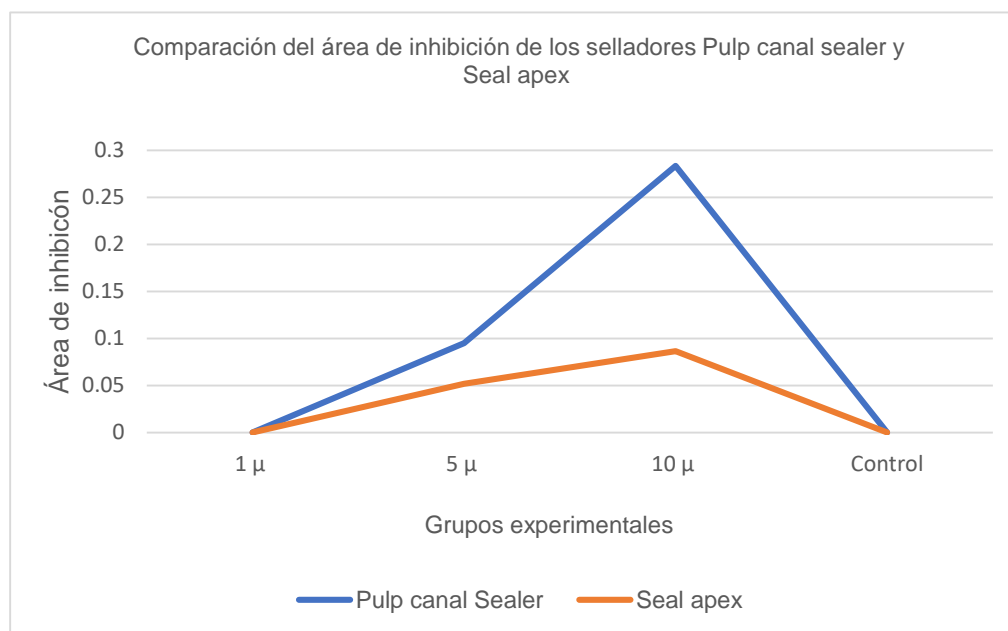


Figura 1. Comparación del área de inhibición de los selladores Pulp canal sealer y Seal apex

En la tabla 2 se observa la comparación de la absorbancia registrada en los medios de cultivo inoculados con *E. faecalis* al estar en contacto con los diferentes cementos y concentraciones de quitosano.

Tabla 2. Comparación de la absorbancia registrada en medios de cultivo inoculados con *E. faecalis* y expuestos a los selladores Pulp canal sealer y Seal apex

	Grupo sin cemento (n=1)	Grupo sin quitosano (n=1)	Quitosano 1 ul (n=1)	Quitosano 5 ul (n=1)	Quitosano 10 ul (n=1)	Valor de p
	Media ± D.E. (Rango)					
Seal apex	1.915 ± 0.036 (1.96-1.88)	1.885 ± 0.047 (1.95-1.84)	1.5775 ± 0.423 (1.92-1.01)	1.095 ± 0.005 (1.1-1.09)	0.91 ± 0.277 (1.15-0.67)	<0.0001*
Pulp canal sealer	1.935 ± 0.038 (1.97-1.88)	1.8925 ± 0.028 (1.93-1.87)	1.7525 ± 0.037 (1.78-1.7)	1.7475 ± 0.029 (1.78-1.71)	1.4875 ± 0.038 (1.54-1.45)	<0.0001*
Valor de P	0.4832	0.7974	0.4414	<0.0001*	0.0062*	

X: Media; D.E. Desviación estándar. Prueba ANOVA Y pos hoc de Tukey y Prueba t de student.

Como podemos observar, en ambos cementos, entre mayor era la concentración de quitosano en el grupo experimental, había un menor crecimiento de *E. faecalis*, lo que resulto en un camino óptico menos denso y una menor concentración de la muestra. **Figura 2**

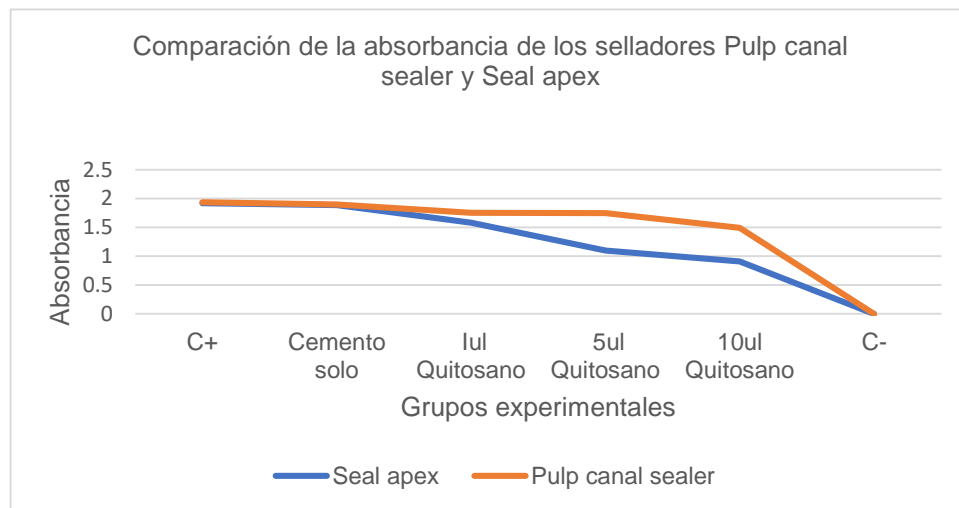


Figura 2. Comparación de la absorbancia de los selladores Pulp canal sealer y Seal apex

4.2 Discusión

Los principales agentes causales de la periodontitis apical y la pulpa necrótica son los microorganismos y sus derivados. La terapia endodóntica es el único tratamiento para preservar los dientes; Si no, los dientes necesitan ser extraídos. La eliminación de los microorganismos y la prevención de la infección son los principales objetivos de la terapia endodóntica (Arora et al., 2014).

La terapia de conductos depende de las fases del tratamiento integral del conducto radicular: el control microbiano, la limpieza, la conformación, y el sellado efectivo del sistema de conductos. Los componentes principales de relleno son: un material de núcleo sólido y un sellador. El material de núcleo más comúnmente utilizado es la gutapercha, que ocupa la mayor parte del espacio del conducto, mientras que el sellador llena la interfaz entre el material del núcleo y la pared de la dentina, ayudando así a obtener un buen sellado.

El objetivo principal del tratamiento endodóntico es obturar el conducto radicular por completo para obtener un conducto radicular estéril, evitando que las bacterias recolonicen dentro del espacio del conducto radicular. Se requiere un sellador bacteriostático para el tratamiento ideal de acuerdo con Grossman (Cavalcanti et al., 2006).

Numerosos selladores endodónticos tienen la capacidad no solo de formar una barrera física entre la interface formada por irregularidades de la pared del conducto y gutapercha, si no de presentar agentes antibacterianos que evitan una recolonización de microorganismos residuales después de una preparación biomecánica. Sin embargo, algunos productos han mostrado una falta de efecto antibacteriano prolongado, biocompatibilidad con su medio y estabilidad dimensional (Baumgartner et al., 2007).

El *Enterococcus faecalis* ha sido uno de los microorganismos considerado como estándar de oro para investigaciones de efecto antibacteriano, debido a su difícil

manera de erradicar, su capacidad adaptativa, así como por la frecuencia de su establecimiento en infecciones endodónticas primarias y persistentes (Beyth et al., 2013).

El propósito de este estudio fue evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de dos cementos selladores con diferentes concentraciones de quitosano, contra *E. faecalis*, utilizando las pruebas de contacto directo (CDT) y difusión en agar (ADT).

La prueba de contacto directo evaluó el efecto antimicrobiano del cemento cuando la bacteria entra en contacto con la superficie de este. La prueba de difusión en agar (ADT) es la técnica comúnmente utilizada para evaluar la actividad antimicrobiana de los materiales dentales, esta técnica no depende sólo de la toxicidad del material sobre el microorganismo, sino también de la alta influencia de su difusión en el medio, la concentración del sellador a examinar, así como el tamaño y forma del agente antimicrobiano.

Dentro de las desventajas de la prueba ADT, está el hecho de que brinda sólo información cualitativa. Una desventaja y la más importante, es que esta técnica debe ser modificada para poderla emplear en organismos de crecimiento lento.

En nuestros resultados de la prueba ADT, en ambos cementos selladores, se pudo observar que tanto los grupos experimentales sin quitosano, como los que tenían 1 ul de quitosano no formaron halos de inhibición. En contraste con los grupos que tenían 5 y 10 ul de quitosano, los cuales si formaron halos de inhibición. El cemento sellador Pulp canal sealer fue el que mostro mayor actividad antibacteriana.

La prueba de contacto directo se basa en la determinación del crecimiento bacteriano en placas de microtitulación de 96 pocillos. La cinética del crecimiento en cada pozo se monitoriza a 600 nm a 37 ° C y se registra cada 30 minutos en un espectrofotómetro de microplacas con temperatura controlada.

En esta prueba pudimos determinar la actividad antibacteriana en los grupos sin quitosano y con 1 ul de quitosano a diferencia de la prueba ADT, donde no se

consiguieron datos en estos grupos. Se determinó que, en ambos cementos, al aumentar la concentración de quitosano, aumentó la actividad antibacteriana.

Morgental et al. (2011) realizaron un estudio para evaluar el efecto de dos selladores de conducto radicular (Endo CPM Sealer y MTA Fillapex) contra *E. faecalis* agregando nanopartículas de quitosano, donde se observó una mayor actividad antimicrobiana en ambos cementos selladores. En comparación con nuestro experimento, se observa una mayor actividad antibacteriana a las 48 horas en ambos cementos selladores. Y comparando ambos cementos selladores el MTA fillapex mostró una mayor actividad antibacteriana, sin embargo, la diferencia no fue significativa. Este experimento en conjunto con el nuestro nos indica que la unión de quitosano con un cemento sellador sin importar su composición química ayuda al aumento de la actividad antibacteriana.

Kim y Shin (2013), evaluaron el efecto antibacteriano contra *E. Faecalis* y las propiedades mecánicas de 3 resinas compuestas modificadas con quitosano en 3 pesos moleculares diferentes (bajo, medio y alto). Los resultados indicaron que todas las concentraciones de quitosano mostraron un efecto inhibitorio ante *E. Faecalis*

Nuestra investigación no evaluó el efecto antibacteriano del quitosano en combinación con otro material que no fuera cemento sellador, sin embargo, debido a las conclusiones planteadas de la literatura anterior, en cuanto efectos antibacteriano del quitosano son notoriamente parecidos con nuestro estudio.

Las nanopartículas de quitosano pueden difundirse potencialmente del sellador y penetrar en los túbulos dentinarios y las complejidades anatómicas. Además de la capacidad del quitosano de ser incorporado en selladores, la estructura química del quitosano también permite la preparación de numerosos derivados que se pueden usar para el tratamiento superficial de los conductos (Bernkop-Schnürch, 2000; Shrestha et al., 2010).

Todavía no ha sido bien decifrado el mecanismo de acción antimicrobiano de este

biopolímero. Una de las principales razones para que el quitosano posea actividad antimicrobiana es la presencia de un grupo amino con carga positiva a pH inferior a 6.3, el cual interactúa con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos, generando un rompimiento o lisis de estas estructuras, que lleva a la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares. Además, el quitosano tiene propiedad quelante, lo que permite que este biopolímero se pueda ligar selectivamente a metales presentes en las estructuras externas de los microorganismos, inhibiendo así la producción de toxinas. También se ha reportado que el quitosano puede inhibir enzimas debido a la interacción quitosano-ADN que altera la síntesis de ARN mensajero. (Bernkop-Schnürch, 2000).

Tanto el cemento sellador Seal ápex como el Pulp canal sealer, al agregar el quitosano, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Enterococcus Faecalis*, sin embargo, Pulp canal sealer demostró que al agregar 5 ul y 10 ul de quitosano tiene una superior actividad antibacteriana, mientras que el grupo que solo se le agregó 1 ul de quitosano o donde solo se utilizó el cemento, demostró una actividad antibacteriana parecida al Sealapex.

Al evaluar la actividad antibacteriana de cementos selladores con composiciones químicas diferentes, se tiene que tener en cuenta sus propiedades y como estas influirán en su manipulación y su comportamiento dentro del tratamiento de conductos, con el fin de tener un efecto directo sobre el microorganismo a erradicar.

En este estudio se colocó especial atención en los cementos al momento de la preparación, ya que ambos cementos presentaron un tiempo de trabajo mucho menor al colocar quitosano, entre mayor era la concentración de quitosano que se colocaba, menor era el tiempo de trabajo. El cemento Pulp canal sealer fue el que presentó menor tiempo de trabajo y con la concentración de 5 ul y 10 ul su manipulación se volvió muy complicada. Es importante destacar que la prueba se estandarizó a 24 horas de observación ya que en este intervalo de tiempo, fue cuando los cementos en combinación con el quitosano mostraron su índice más alto de actividad antibacteriana.

4.3 Conclusiones

Al comparar ambos cementos selladores sin quitosano y con 1 ul de quitosano encontramos que no se presentó alguna diferencia significativa importante, pero si se mostró una diferencia significativa con las concentraciones de 5 y 10 ul siendo el Pulp canal sealer el que presento una mayor actividad antibacteriana. En ambos cementos selladores en combinación con quitosano mostraron su índice más alto de actividad antibacteriana a las 24 horas. Al revisar la literatura, podemos concluir que al agregar quitosano al cemento sellador su actividad antimicrobiana aumentara sin importar su composición química, podrá haber variaciones dependiendo del cemento, pero siempre aumentara su actividad.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Angmar-Månsson, B., Omnell, K.-Å. & Rud, J., 1969. Root fractures due to corrosion. Metallurgical aspects. *Odontologisk revy.* 20(3): 245.
- Baumgartner, J.C., Falkler, W.A. & Beckerman, T., 1992. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Molecular Oral Microbiology.* 7(4): 253–256.
- Bernkop-Schnürch, A., 2000. Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems. *International journal of pharmaceutics.* 194(1):1–13.
- Byström, A. et al., 1987. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Dental traumatology.* 3(2): 58–63.
- Carr, G.B. et al., 2009. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. *Journal of endodontics.* 35(9):1303–1309.
- Costerton, B., 2004. Microbial ecology comes of age and joins the general ecology community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101(49):16983–16984.
- Dahlén, G. et al., 1982. Apical periodontitis induced by selected bacterial strains in root canals of immunized and nonimmunized monkeys. *European Journal of Oral Sciences.* 90(3): 207–216.
- DaSilva, L. et al., 2013. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *Journal of endodontics.* 39(2): 249–253.
- Engstrom, B., 1964. Correlation of positive culture with the prognosis for root canal treatment. *Odontol. Revy.* 15(1): 257–270.
- Fabricius, L. et al., 1982. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *European Journal of Oral Sciences.* 90(3): 200–206.
- Friedman, S., 2002. Considerations and concepts of case selection in the management of post-treatment endodontic disease (treatment failure). *Endodontic Topics.* 1(1): 54–78.
- Gomes, B., Lilley, J.D. & Drucker, D.B., 1996. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal.* 29(4): 235–241.
- Takehashi, S., Stanley, H.R. & Fitzgerald, R.J., 1965. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.* 20(3): 340–349.

- Kayaoglu, G. et al., 2005. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*. 38(7): 483–488.
- Kishen, A. et al., 2008. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *Journal of endodontics*. 34(12): 1515–1520.
- Kontakiotis, E., Nakou, M. & Georgopoulou, M., 1995. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *International endodontic journal*. 28(6): 285–289.
- Di Martino, A., Sittinger, M. & Risbud, M. V, 2005. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 26(30): 5983–5990.
- McComb, D. & Smith, D.C., 1976. Comparison of physical properties of polycarboxylate-based and conventional root canal sealers. *Journal of endodontics*. 2(8): 228–235.
- Möller, A.J., 1966. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies*. *Odontologisk tidskrift*. 74(5):1.
- Möller, Å.K.E.J.R. et al., 1981. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *European Journal of Oral Sciences*. 89(6): 475–484.
- Molven, O., Olsen, I. & Kerekes, K., 1991. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Dental Traumatology*. 7(5): 226–229.
- Muzzarelli, R.A.A. et al., 1998. Osteogenesis promoted by calcium phosphate N, N-dicarboxymethyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 36(4): 267–276.
- Nair, P.N.R., 1987. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of Endodontics*. 13(1): 29–39.
- Ørstavik, D., Kerekes, K. & Eriksen, H.M., 1987. Clinical performance of three endodontic sealers. *Dental Traumatology*. 3(4): 178–186.
- Ørstavik, D. & Pitt Ford, T.R., 1998. Apical periodontitis: microbial infection and host responses. *Essential endodontology. Prevention and treatment of apical periodontitis*. Oxford: Blackwell Science. 1(1): 1–8.
- de Paz, L.C., 2007. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *Journal of endodontics*. 33(6): 652–662.
- Ricucci, D. et al., 2009. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *Journal of Endodontics*. 35(4): 493–502.

Rud, J. & OMNELL, K., 1970. Root fractures due to corrosion diagnostic aspects. *European Journal of Oral Sciences*. 78(1-4): 397–403.

Schaudinn, C. et al., 2009. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM–SEM). *Journal of microscopy*. 235(2): 124–127.

Schilder, H., 2006. Filling root canals in three dimensions. *Journal of endodontics*. 32(4): 281–290.

Shrestha, A. et al., 2010. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *Journal of endodontics*. 36(6): 1030–1035.

Shrestha, A., Hamblin, M.R. & Kishen, A., 2012. Characterization of a conjugate between Rose Bengal and chitosan for targeted antibiofilm and tissue stabilization effects as a potential treatment of infected dentin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 56(9): 4876–4884.

Siqueira, J.F. et al., 1998. Pathogenicity of facultative and obligate anaerobic bacteria in monoculture and combined with either *Prevotella intermedia* or *Prevotella nigrescens*. *Molecular Oral Microbiology*. 13(6): 368–372.

Siqueira, J.F. & Rôças, I.N., 2009. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 107(6): 870–878.

Siqueira, J.F. & de Uzeda, M., 1997. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *Journal of endodontics*. 23(3): 167–169.

Sjögren, U. et al., 1997. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International endodontic journal*. 30(5): 297–306.

Skinner, R.L. & Himel, V.T., 1987. The sealing ability of injection-molded thermoplasticized gutta-percha with and without the use of sealers. *Journal of endodontics*. 13(7): 315–317.

Sundqvist, G., 1976. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. Sundqvist, G.K. et al., 1979. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infection and Immunity*. 25(2), 685–693.

Svensäter, G. & Bergenholtz, G., 2004. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics*. 9(1): 27–36.

Tagger, M. & Tagger, E., 1989. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26® in monkeys. *Dental Traumatology*. 5(3): 139–146.

Trope, M., 2003. The vital tooth—its importance in the study and practice of endodontics. *Endodontic Topics*. 5(1): 1.

Weiger, R. et al., 1995. Adhesion of a glass ionomer cement to human radicular dentine. *Dental Traumatology*. 11(5): 214–219.

Weiss, E.I., Shalhav, M. & Fuss, Z., 1996. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Dental Traumatology*. 12(4): 179–184.

Wu, M., Dummer, P.M.H. & Wesselink, P.R., 2006. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *International endodontic journal*. 39(5): 343–356.

Xu, Z. et al., 2011. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 98(1): 150–159.X