

Capacidad antibacteriana de seis agentes desinfectantes en la terapia endodóntica

MsC. Jose Rafael Mora Solera.
CD. Daniel Silva-Herzog Flores.
PhD. Amaury de Jesús Pozos Guillén.

Reimpresiones o consultas a: Jose Mora en endomora@gmail.com o frente iglesia San Antonio, CQ, San Carlos, AL, CR, Clínica Dental Drs. Mora.

Objetivo. Evaluar la capacidad antibacteriana del NaOCl al 1% con y sin una aplicación final de NaOCl al 6% por 5 minutos; dos medicamentos intraconducto de uso común (CHX en gel al 2% y el Ca(OH)₂ en pasta al 95%) y de dos sistemas de obturación (Gutapercha con cemento de óxido de zinc y eugenol y Resilon con Epiphany).

Metodología. Ciento treinta y siete raíces palatinas de molares superiores fueron segmentadas y preparadas con una fresa Peeso Largo #2. Fueron limpiadas con EDTA al 17% y NaOCl al 5.25% y autoclavadas. Se infectaron por 2 semanas con *E. faecalis* resistente a estreptomycin. A los especímenes se les aplicó los tratamientos y sus respectivos controles. Después del periodo de incubación para cada agente de desinfección endodóntica, se tomó la muestra bacteriológica, con fresa Peeso Largo #5 en medio con TSB con estreptomycin y se midió la turbidez del medio con 24 horas de crecimiento bacteriano por espectrofotometría en el aparato de ELISA.

Resultados. El NaOCl al 1% con una aplicación final del mismo producto al 6% por 5 minutos, la CHX y el sistema de obturación de gutapercha con cemento de óxido de zinc y eugenol no presentó diferencia con los controles negativos siendo todos los anteriores efectivos contra el *E. faecalis*. Mientras que NaOCl al 1% ($p > 0.01$), Ca(OH)₂ y Resilon con Epiphany tienen una capacidad antibacteriana muy limitada ($p < 0.01$).

Conclusiones La irrigación con NaOCl al 1% con una aplicación al 6% durante 5 minutos, la medicación intraconducto de clorhexidina en gel al 2% durante 7 días y el sistema de obturación de gutapercha con cemento de óxido de zinc y eugenol (SILCO), son efectivos en la eliminación del *E. faecalis* intraconducto e intratubular.

PALABRAS CLAVES: IRRIGANTES ENDODÓNTICOS, MEDICACIÓN INTRACONDUCTO, SISTEMA DE OBTURACIÓN ENDODÓNTICA, *E. FAECALIS*, INFECCIÓN DE LOS TÚBULOS DENTINALES

Introducción

La presencia de bacterias en el conducto induce a enfermedad crónica periapical (Kakehashi *et al.* 1965), por ello uno de los más importantes objetivos del tratamiento endodóntico es la eliminación de todos los microorganismos del sistema de conductos (Gomes *et al.* 2003).

El éxito del tratamiento endodóntico está directamente influenciado por la eliminación de los microorganismos en los conductos infectados, esto se logra con agentes antimicrobianos como irrigantes, medicamentos intraconducto y sistemas de obturación con capacidad antibacteriana (Estrela *et al.* 2003).

El proceso para reducir o eliminar la microbiota de conductos infectados, es complicado debido al extraño complejo anatómico interno del sistema de conductos, y la dinámica de la relación huésped-hospedero. Este proceso se llama limpieza químico-mecánica. El proceso mecánico se basa en asepsia que reduce la cantidad de bacterias, por medio de arrastre mecánico por irrigantes o limas e instrumentos rotatorios mientras que el proceso químico consiste en el uso de agentes desinfectantes.

Los agentes responsables del control de la infección endodóntica han sido estudiados en diferentes áreas de salud (Al-Holy *et al.* 2005, Crebelli *et al.* 2005). La selección de un control microbiológico efectivo de los conductos requiere atención debido que generalmente las soluciones irrigadoras que afectan al huésped afectan al hospedador, y aquellas compatibles al hospedador no destruyen al huésped. Los agentes antibacterianos deberían suprimir o destruir el crecimiento bacteriano, por medio de alta susceptibilidad de los microorganismos, una adecuada penetración de agentes antibacterianos al sitio de infección, una concentración necesaria de los agentes desinfectantes, baja toxicidad de las células del hospedero y evitar el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos a los agentes desinfectantes (Estrela *et al.* 2002, Sundqvist 1994, Nair 2000).

Se han propuesto muchos agentes químicos desinfectantes en la preparación del conducto (Turner *et al.* 2004, Nagayoshi *et al.* 2004, Shabahang & Torabinejad 2003, Al-Kilani *et al.* 2003, Grandini *et al.* 2002), pero el más comúnmente usado en endodoncia es el hipoclorito de sodio (Spanó *et al.* 2001).

La solución de hipoclorito de sodio es importante durante la preparación del conducto, debido a su

capacidad limpiadora, que actúa como lubricante a las limas e instrumentos rotatorios, elimina los restos de tejido de forma mecánica, tiene efecto antibacterial y de disolución de los tejidos, sin dañar los tejidos periapicales (Estrela *et al.* 2002). La selección del irrigante ideal depende la capacidad ante los microorganismos y en los tejidos periapicales. El hipoclorito de sodio, es un agente antibacterial usado frecuentemente en tratamientos endodónticos y periodontales (Bystrom *et al.* 1981, Estrela *et al.* 2002, Rolla & Melsen 1975, Jenkins & Addy 1988, Vahdaty *et al.* 1993, Estrela *et al.* 1995). Por ello la necesidad de este en el tratamiento endodóntico como auxiliar irrigante, obliga a comprender su actividad sobre las células bacterianas (Estrela *et al.* 2002).

El mecanismo de acción antibacterial del hipoclorito de sodio se basa en las propiedades antibacterianas, que se fundamenta en un alto pH (acción de los iones hidroxilo), con un mecanismo similar al del hidróxido de calcio (Estrela *et al.* 1995, Estrela *et al.* 2002). El alto pH del hipoclorito de sodio interfiere en la integridad de la membrana citoplasmática con una inhibición irreversible enzimática, alteraciones biosintéticas en el metabolismo de la célula y destrucción de fosfolípidos observado en una peroxidación lipídica. La reacción de cloraminación de los aminoácidos forma cloraminas que interfieren en el metabolismo celular. La oxidación promueve una inhibición enzimática irreversible de las bacterias reemplazando el hidrógeno con cloruro. La inactivación enzimática puede ser observada en la reacción de cloruro con grupos aminos (NH₂-) y una oxidación irreversible de grupos sulfidrilos (SH) de enzimas bacterianas (cisteína). Así, el hipoclorito de sodio presenta actividad antibacteriana con acción sobre las enzimas esenciales bacterianas promoviendo una inactivación irreversible originada por iones hidroxilos y acción de cloraminación. La disolución del tejido orgánico puede ser verificado en la reacción de saponificación con la destrucción de grasas y lípidos, resultando en jabón y glicerol (Estrela *et al.* 2003).

La preparación químico-mecánica reduce la carga bacteriana considerablemente, pero en casos infectados donde se supone que la carga bacteriana es alta, se coloca generalmente una medicación intraconducto (hidróxido de calcio comúnmente o clorhexidina en gel) con acción antibacteriana que aumente la desinfección (Bystrom *et al.* 1985).

El hidróxido de calcio juega un papel importante en endodoncia ya que induce a la formación de tejido duro, tiene acción contra bacterias, y tiene capacidad de disolver tejido (Nerwich *et al.* 1993). Así mismo la medicación de hidróxido de calcio actúa como una barrera y previene la reinfección del conducto e interrumpe el suplemento nutricional de las bacterias recidivas (Siqueira & Lopes 1999). Así mismo el mecanismo de acción antibacteriano se debe a que los iones hidroxilo (OH) aumentan del pH, cercano a 12.5 y tiene un efecto destructivo en las membranas celulares y estructuras de las membranas. Cuando las bacterias se encuentran localizadas dentro de los túbulos dentinales, los iones hidroxilo del hidróxido de calcio

podrían difundir dentro de la dentina a concentraciones suficientes y podría exceder la capacidad buffer de la dentina, produciendo niveles de pH suficientes para destruir la bacteria (Siqueira & Lopes 1999).

El gluconato de clorhexidina ha sido muy usado en periodoncia por su capacidad antibacteriana (Koshy *et al.* 2004, Santos *et al.* 2004). En endodoncia se ha propuesto como un irrigante y medicamento intraconducto (Ercan *et al.* 2004, Wuerch *et al.* 2004). La clorhexidina tiene un efecto inhibitorio sobre las bacterias comunes del conducto, actuando contra bacterias gram positivas y negativas. Uno de los mecanismos que explican la eficacia de este medicamento se basa, en la interacción entre los cambios positivos de las moléculas y cambios negativos de grupos fosfato en la pared de la célula bacteriana, que permite a las moléculas de clorhexidina penetrar dentro de la bacteria con efectos tóxicos (Lindskog *et al.* 1998, Gomes *et al.* 2003).

El gluconato de clorhexidina es una biguanida catiónica que actúa por absorción dentro de la pared celular de los microorganismos causando filtración de componentes intracelulares. A bajas concentraciones sustancias pesadas de moléculas pequeñas, resultan en un efecto bacteriostático, pero en altas concentraciones es antibacterial, debido a la precipitación y/o coagulación del citoplasma, causado probablemente por uniones cruzadas de proteínas. La clorhexidina en gel tiene importantes propiedades, como son baja toxicidad a los tejidos periapicales, viscosidad que permite mantener el agente activo, en contacto de las paredes del conducto y túbulos dentinales y es soluble en agua (Ercan *et al.* 2004).

A pesar de los irrigantes, y medicaciones intraconducto como desinfectantes, la eliminación total de las bacterias es difícil de conseguir en todos los casos (Bystrom & Sundqvist 1983).

Los microorganismos remanentes pueden ser eliminados o inhibidos por la adecuada obturación endodóntica, con gutapercha y sellador con capacidad antibacteriana o de limpieza químico-mecánica (Saleh *et al.* 2004).

La capacidad bacteriana de la obturación endodóntica en ausencia de iones capaces de eliminar o inhibir bacterias, se debe a una explicación mecánica, que se basa, en hacer un medio, privado de nutrientes y espacio para la multiplicación (Saleh *et al.* 2004).

El sistema convencional de obturación a base de gutapercha está conformado por, un material sólido o semisólido llamado gutapercha, que consiste en el cuerpo de la obturación y se extiende a todo lo largo de la obturación. El material no sólido o coloidal, es el cemento sellador, que consiste en una combinación de polvo-líquido o pasta-pasta, y al igual que la gutapercha se extiende a todo lo largo de la obturación pero consiste en formar parte del cuerpo de la obturación ya que su función es unir las puntas de gutapercha a las paredes del conducto y entre sí, además de rellenar los espacios que este material no obturó, entre otras funciones (Schilder 1967).

Actualmente la gutapercha está compuesta de materia orgánica (polímeros de gutapercha y cera o resinas) e inorgánica (óxido de zinc, sulfato de bario). Contiene pequeña cantidad de colorante y agentes antioxidantes. De hecho se dice que la gutapercha tiene capacidad antibacteriana y se le atribuye a la presencia de óxido de zinc (del 37% al 75%), pero puede variar debido a que los componentes son diferentes según las casas comerciales (Gurgel-Filho *et al.* 2003).

El cemento de óxido de zinc y eugenol es posiblemente el cemento más usado en endodoncia. Este cemento es simplemente óxido de zinc con eugenol (ZnOE) modificado para su uso en endodoncia. El líquido (Eugenol) se mezcla con las partículas finas del polvo (ZnO) para formar una sola sustancia coloidal fluida que se une a la gutapercha (Hauman & Love 2003).

Muchos productos y materiales han sido probados con la finalidad de sustituir a la gutapercha, debido a que este material, se ha usado como el estándar de oro por más de 100 años en la práctica endodóntica. Hasta el siglo XXI se introdujo al mercado el Resilon (RMS), constituido principalmente de polímeros de poliéster, el nuevo sistema de obturación a base de resilon, ha demostrado tener muchas ventajas en comparación con el sistema convencional de gutapercha (Mora JR 2005).

Los materiales de sellado endodóntico con resina están ganando popularidad y están siendo aceptados por producir un sistema de adhesión más resistente a la penetración bacteriana que otros cementos endodónticos (Shipper *et al.* 2005). Por ello el uso de un material que pudiese sellar todo el conducto desde apical hasta coronal evitaría en la mayoría de los casos el fracaso endodóntico. Resilon (Resilon Research LLC, Madison, CT) es un material termoplástico sintético hecho a base de polímeros de poliéster, aplicado a la obturación endodóntica. Sus componentes se basan específicamente en resinas, radiopacificadores y rellenos, con gran fluidez que permite que este material forme penetraciones en túbulos dentinales que una vez eliminada la capa de barro dentinario (Shipper *et al.* 2004).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antibacteriana de seis agentes desinfectantes de uso común en endodoncia;

- 1. Evaluar la capacidad antibacteriana de dos irrigantes en endodoncia, hipoclorito de sodio al 1% e hipoclorito de sodio al 1% más una aplicación del mismo al 6% por 5 minutos.**
- 2. Evaluar la capacidad antibacteriana de dos medicamentos intraconducto, clorhexidina en gel al 2% e hidróxido de calcio al 95% en pasta.**
- 3. Evaluar la capacidad antibacteriana de dos sistemas de obturación, gutapercha con cemento de óxido de zinc y eugenol y resilon con el cemento Epiphany de Pentron.**

Materiales y Métodos

Selección y preparación de las muestras

El método que se usó para determinar la capacidad antibacteriana de irrigantes, medicamentos intraconducto y sistemas de obturación, se basó en el método usado por Haapasalo & Orstavik (1987) con algunas modificaciones. Se utilizaron 137 raíces palatinas de primeras y segundas molares superiores, que debían ser de un solo conducto recto y sin variantes anatómicas, los cuales se mantuvieron en solución salina estéril al 0.9% hasta recolectar la totalidad de las muestras. Los dientes fueron limpiados mecánicamente con curetas periodontales, con el cuidado de no dañar la superficie de la raíz. Cada raíz fue segmentada aproximadamente 3 mm del ápice y se ajustó en coronal hasta que tuvieran una medida de 7 mm de longitud, con una fresa Endo Zecrya (Dentsply, Maillefer-Dentsply Inc. Switzerland) montada en una pieza de alta velocidad con irrigación propia, formando bloques de dentina de aproximadamente 5 mm de ancho en un extremo, con 3 mm en el otro extremo y con 7 mm de largo. Las muestras fueron preparadas a través del conducto de lado a lado con una fresa Peeso Largo #2 (Dentsply, Maillefer, Paris, Fr) montada en una pieza de baja velocidad con enfriamiento con agua. Una vez preparado el espacio pulpar, las muestras se colocaron en baño ultrasónico (BioSonic UC50, Coltène/Whaledent Inc., NJ, EEUU) con EDTA al 17% durante 2 minutos (eliminación de materia inorgánica) seguido por NaOCl al 5% (Cloralex, Alen del sureste S.A. de C.V., Tab, Mex) por 4 minutos (eliminación de materia orgánica), finalmente se repitió el baño ultrasónico de EDTA al 17% por 1 minuto y 1 minuto más de solución salina, para eliminar todo tejido remanente orgánico e inorgánico y restos de las soluciones. A continuación las piezas fueron colocadas en una bolsa de esterilización (AssurePlus, Sultan Chemists, Inc, NJ, EEUU) en autoclave (Biocare Vacuum, Zeyco, DF, Mex.) a 121 grados centígrados con 15 libras de presión durante 20 minutos.

La limpieza y apertura de los túbulos dentinales fueron verificados en dos muestras seleccionadas bajo microscopía electrónica de barrido a una magnificación de 1000X (Figura 1). Para comprobar la esterilidad de las muestras se incubaron en 100 mL de TSB (Caldo Soya Trypticaseína) (BD Bioxon, Becton Dickinson de México S.A. de C.V., DF, Mx), durante 24 horas a 37 grados centígrados.

Para la infección de los túbulos dentinales se usó *Enterococcus faecalis* resistente a estreptomycin aislado de la orofaringe e identificado con MicroScan para bacterias Gram positivas (Dade Behring Inc. CA, USA).

En 100 mL de Caldo soya Trypticaseína con 2 mg Estreptomycin por cada mL de caldo (TSB+E) contenidos en el matraz 115 muestras fueron infectadas con una azada de la bacteria, y se dejó incubar por 24 horas a 37 grados centígrados. Se introdujo dentro del mismo matraz una pastilla agitadora estéril y se colocó en el

agitador magnético a velocidad mínima por 2 horas, y se dejaron incubar por dos semanas con recambio cada 24 horas del medio de cultivo y bacterias con 24 horas de crecimiento.

Dos muestras fueron seleccionadas al azar para verificar la presencia de bacterias en la superficie dental interna con microscopia electrónica de barrido (Figura 2) y otras tres para observar la penetración de las bacterias dentro de los túbulos dentinales en cortes de 7µm con tinción de Brown and Breen modificada (Figura 3).

Una vez verificada la infección de los túbulos dentinales las 115 muestras se dividieron entre todos los agentes desinfectantes y respectivos controles (Figura 4).

Grupos experimentales y controles

Sustancias de irrigación

NaOCl 1% (15 muestras infectadas): se irrigaron con 1.8 mL de hipoclorito de sodio al 1% 6 veces (simulando los usos en el tratamiento clínico), con una aguja de anestesiarse estéril montada en una jeringa de anestesiarse y se secó con punta de papel previamente esterilizada (Viarden, Viarden S.A. de C.V.). Se tomó la muestra con una fresa Peeso Largo #5 (Dentsply, Maillefer, Paris, Fr) estéril (300 µm de dentina) (Figura 5) de manera que las partículas de dentina cayeran sobre 2 mL de TSB estéril con estreptomina, y se dejó incubar por 24 horas.

NaOCl 1% + 6% (15 muestras infectadas): Se utilizó la misma metodología del grupo NaOCl 1%, con la variante de que al final de la irrigación se efectuó una colocación de NaOCl al 6% por 5 minutos antes de secar.

Control Positivo 24 hrs (10 muestras infectadas): Se utilizó la misma metodología del grupo NaOCl 1%, solo que la aplicación fue de Cloruro de Sodio al 0.9%.

Control Negativo 24 hrs (10 muestras estériles): Los especímenes de este grupo se mantuvieron en TSB estéril con 2 mg de estreptomina x mL de TSB, pero no se les inoculó *E. faecalis*. Igualmente que los otros grupos los especímenes fueron secados antes de que se tomara la muestra.

Medicaciones intraconducto

Ca(OH)2 95% (15 muestras infectadas): Las muestras se secaron con puntas de papel estériles, y se les administró Hidróxido de Calcio preparado al 95% (Sigma, Sigma Chemical CO. MO, EEUU) con una jeringa, hasta que se observara en el otro extremo del cilindro. Las muestras se envolvieron en gaza estéril en humedad parcial con cloruro de sodio al 0.9% estéril, y se incubaron en un recipiente sellado, a 37 grados centígrados por 7 días. A continuación se desobturó el conducto con una fresa Peeso Largo #2 estéril y se tomó la muestra con una fresa Peeso Largo #5 estéril de manera que las partículas de dentina cayeran sobre 2 mL de TSB con estreptomina, y se dejó incubar por 24 horas.

CHX 2% (15 muestras infectadas): Se utilizó la misma metodología del grupo Ca(OH)2 95% con la variante de que el medicamento que se usó fue clorhexidina en gel al 2% (Ultradent, Ultradent Products, Utah, EEUU).

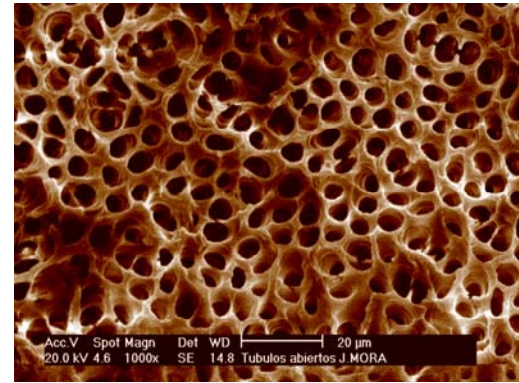


Figura 1. Túbulos dentinales abiertos y limpios después de un tratamiento ultrasónico con EDTA y NaOCl (magnificación 1000X, coloración sepia).

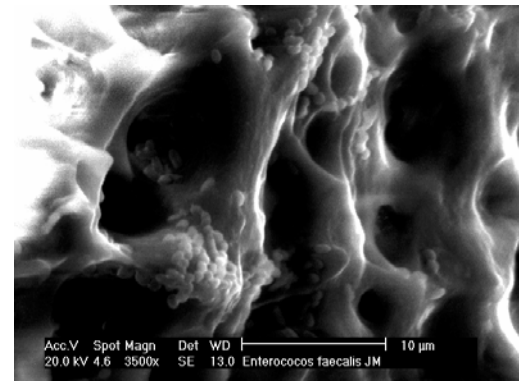


Figura 2. Zona superficial de los túbulos dentinales infectados con *E. Faecalis* (magnificación de 3500X).

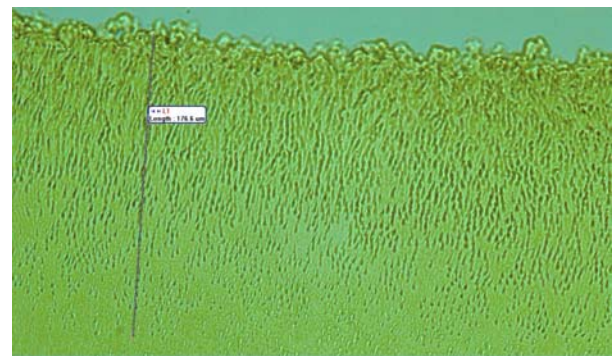


Figura 3. Tinción de Brown and Breen modificada, para observar la penetración bacteriana. Las bacterias se coloran oscuras y el fondo color claro (penetración de 176.6 µm, magnificación de 40X).

Sistemas de obturación

G/ZnOE (15 muestras infectadas): Las muestras se secaron con puntas de papel estériles, y se obturaron con una punta de gutapercha #90 (Zipperer Endoline, United Dental Manufacturers, Inc. FL, EEUU) y cemento de Óxido de Zinc y Eugenol (SILCO, Productos endodónticos especializados, San Luis Potosí., México) preparado según las especificaciones del fabricante. La incubación, desobturación y toma de la muestra de los especímenes se realizó de la misma forma que el grupo Ca(OH)2 95% y CHX 2%.

R/E (15 muestras infectadas): Las muestras se secaron con puntas de papel estériles, y se obturaron con una

punta de resilon #90 (Resilon Research LLC, Madison, CT) y cemento de resina (Epiphany, Pentron Corporation, Wallingford, CT, EEUU), la obturación se realizó según indica el fabricante. La incubación, desobturación y toma de la muestra de los especímenes se realizó de la misma forma que el grupo Ca(OH)₂ 95%.

Controles para medicamentos y sistemas de obturación

Control Positivo 7 días (10 muestras infectadas): Los especímenes obtuvieron el mismo tratamiento de los grupos anteriores pero sin aplicarse ningún tratamiento.

Control Negativo 7 días (10 muestras estériles): Se maneja de la misma manera que el control positivo pero ausente de bacterias.

Análisis Microbiológico

El polvo de la dentina fue recolectada de cada espécimen y colocado inmediatamente en 2 mL de TSB con estreptomina y se dejó incubar por 24 horas, la turbidez que se formó con el crecimiento bacteriano fue medido por espectrofotometría con una longitud de onda de 540 nm en el lector de ELISA en platos de poliestireno de 96 pozos cilíndricos de base plana, donde se utilizó como solución blanco medio de cultivo estéril. La densidad óptica fue proporcional al número de bacterias presentes. Para verificar el tipo de bacteria y descartar contaminación se realizó las siguientes pruebas a las muestras que presentaron turbidez; prueba de tinción de Gram, prueba de resistencia a la estreptomina en medio líquido, prueba de cloruro de sodio al 6.5% en medio líquido, prueba de catalasa, prueba de pureza de la sepa en agar sangre de carnero.

Se estableció como criterio de exclusión del estudio a la contaminación de los medios de cultivo, la imposibilidad de demostrar el *E. faecalis*, y la precipitación de las partículas de dentina en el medio de TSB+E.

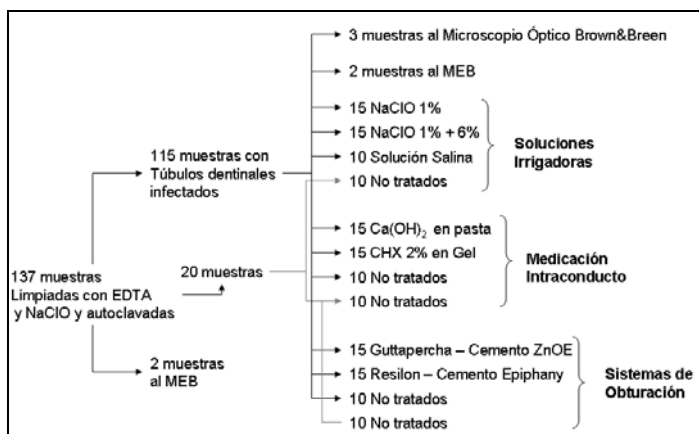


Figura 4. Distribución de las muestras en los tratamientos en prueba.

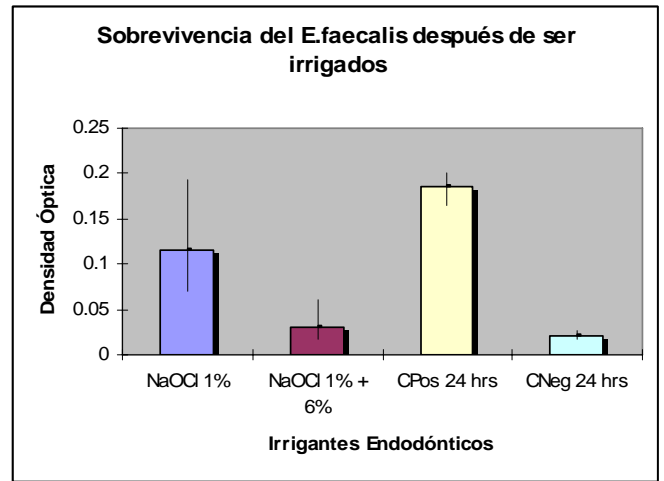


Figura 5. Acción antibacteriana de los irrigantes endodónticos contra el *E. faecalis* en túbulo dentales infectados (Medianas y Rangos)

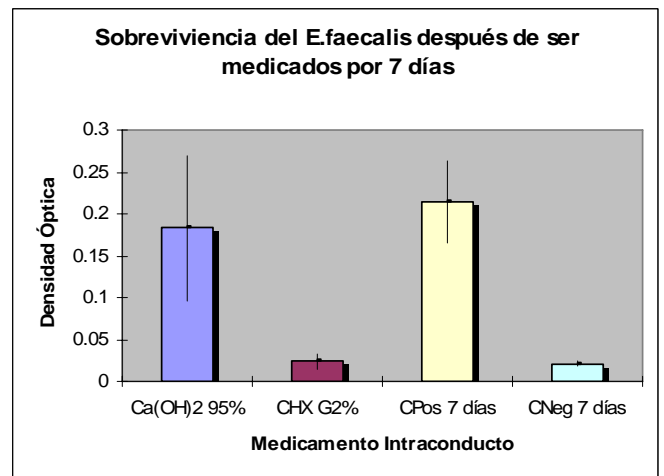


Figura 6. Acción antibacteriana de los medicamentos intraconducto contra el *Enterococos faecalis* en túbulo dentales infectados (Medias y DE)

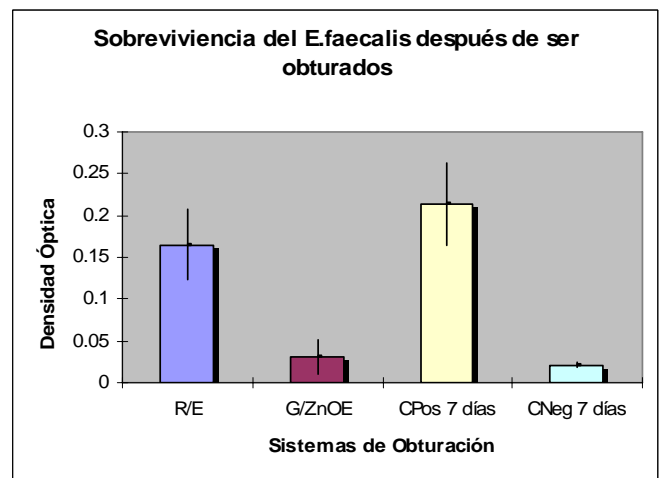


Figura 7. Acción antibacteriana de los sistemas de obturación contra el *Enterococos faecalis* en túbulo dentales infectados (Medias y DE)

Tabla 1. Resultados obtenidos por todos los grupos experimentales y controles

	n	Media	Desv. Est.	Mediana	Rango
NaOCl 1%	15	0.113867	0.032339	0.116 b	0.071 - 0.193
NaOCl 1% + 6%	13	0.033692	0.014273	0.031 a	0.017 - 0.06
C. Pos 24 hrs	10	0.184100	0.010588	0.185 c	0.164 - 0.201
C. Neg 24 hrs	10	0.021700	0.002983	0.0215 a	0.017 - 0.026
R/E	15	0.165200 b	0.041566	0.164	0.101 - 0.23
G/ZnOE	15	0.030800 a	0.020207	0.022	0.015 - 0.082
Ca(OH)₂ 95%	14	0.183000 b	0.086634	0.201	0.077 - 0.31
CHX G2%	15	0.023667 a	0.009619	0.022	0.012 - 0.037
C. Pos 7 días	10	0.214400 b	0.049619	0.204	0.143 - 0.301
C. Neg 7 días	10	0.021100 a	0.002685	0.0205	0.017 - 0.026

Las letras en las celdas de las medianas con letras diferentes presentaron diferencia significativa del $p < .01$.

Análisis Estadístico

La densidad óptica se usó para representar los resultados. A mayor densidad óptica, mayor crecimiento bacteriano y menor capacidad antibacteriana el tratamiento en prueba. Se obtuvieron las medidas de tendencia central y dispersión en cada uno de los grupos. Para observar las posibles diferencias estadísticas entre los grupos se usó un análisis no paramétrico (Tukey-Kramer) para irrigantes y controles de 1 día y análisis paramétrico (t Student) entre los grupos de medicamentos intraconducto y selladores endodónticos y controles de 7 días, esto de acuerdo a la distribución de los residuos del modelo. Para todos los grupos se usó un alfa de 0.01 ($\alpha = .01$). El programa que se usó para el análisis fue JMP IN 4.0.2 (SAS Institute Inc, EEUU). Los grupos se compararon según su función, irrigantes, medicamentos intraconducto y sistemas de obturación, cada uno con sus respectivos controles.

Resultados

Uno de los resultados del grupo de Ca(OH)₂ 95% y dos del NaOCl 1% + 6% fue eliminado del estudio, debido a la precipitación de partículas de dentina en el medio de cultivo. Ninguna muestra fue excluida por contaminación.

Los resultados de la densidad óptica, fueron ilustrados en la tabla 1. El crecimiento bacteriano se encontró en todas las muestras de los controles positivos, y estuvieron ausentes en las muestras de los controles negativos. En el grupo de irrigantes inhibió mayor cantidad de bacterias seis irrigaciones de hipoclorito de sodio al 1% con una aplicación final de 5 minutos con el mismo producto al 6% ($p > 0.01$ con el control negativo), mientras que cuando se usó al 1% sin la aplicación final al 6%, inhibió bacterias, encontrándose diferencia con el control positivo, pero también con el control negativo ($p < 0.01$) por lo cual se demostró que este grupo disminuye la carga bacteriana pero no elimina la bacteriana totalmente (figura 5). Para los medicamentos intraconducto, la clorhexidina en gel al 2%, inhibió totalmente la sobrevivencia de la bacteria, comportándose similar al control negativo, mientras que el hidróxido de calcio, no tuvo efecto alguno significativo contra el *E. faecalis* ($p > 0.01$ con el control positivo)

(figura 6). El sistema de obturación de gutapercha con cemento de óxido de zinc y eugenol, inhibió casi totalmente el *E. faecalis* en un período de 7 días, encontrándose un mínimo crecimiento sin diferencia estadística al control negativo, mientras que el sistema de Resilon con Epiphany se comportó similar al control positivo de 7 días de incubación ($p > 0.01$) (figura 7).

Discusión

Los túbulos dentinales pueden actuar como un depósito de bacterias que terminaría en la infección o reinfección durante o después del tratamiento endodóntico (Oguntebi 1994, Siquiera & Lopes 1999). Por ello en el este trabajo se utilizó la metodología de infección y desinfección de túbulos dentinales de Haapasalo & Orstavik (1987) con algunas modificaciones. Esta prueba ha servido para medir la capacidad antibacteriana de irrigantes (Baker *et al.* 2004, Orstavik & Haapasalo 1990), medicamentos intraconducto (Gomes *et al.* 2003, Basrani *et al.* 2003, Fuss *et al.* 2002) y selladores endodónticos (Saleh *et al.* 2004, Heling & Chandler 1996).

Enterococcus faecalis fue usado como el microorganismo de prueba debido a; (i) que esta asociado con las inflamación periapical persistente en situaciones clínicas (Sundqvist *et al.* 1998, Saleh *et al.* 2004), (ii) es una bacteria de tipo cocos y anaerobia facultativa gram positiva, que ha servido para modelos experimentales de túbulos dentinales infectados (Gomes *et al.* 2003, Saleh *et al.* 2004, Peters *et al.* 2000, Lenet *et al.* 2000), (iii) fácilmente cultivable en condiciones aerobias o anaerobias (Lenet *et al.* 2000), (iv) coloniza fácilmente los túbulos dentinales de bovinos y humanos (Orstavik & Haapasalo 1990, Saleh *et al.* 2004), (v) puede ser usado en medios de cultivos específicos con antibióticos, debido a la resistencia a estos, para reducir la contaminación (Saleh *et al.* 2004, Barthel *et al.* 1999) y (vi) no se necesita técnicas de identificación molecular ya que las bacterias viables son fácilmente identificable con pruebas bioquímicas.

En este estudio, las partículas de dentina fueron recolectados en TSB con un agregado de 2 mg de antibiotico por cada mililitro de TSB para hacer un medio de cultivo específico al *Enterococcus faecalis* resistente a

la estreptomycin, y evite el crecimiento de otras bacterias pero permita el del *E. faecalis* (Saleh *et al.* 2004, Barthel *et al.* 1999).

Haapasalo & Orstavik (1987), determinaron el crecimiento bacteriano por unidades formadoras de colonias (CFU's), lo cual no se realizó en este estudio. Este trabajo utilizó mediciones de crecimiento bacteriano por turbidimetría, reportando absorbancia, debido a que otras investigaciones han logrado medir adecuadamente y de una forma más sencilla los resultados de las investigaciones (Gomes *et al.* 2003, Heling & Chandler 1996).

Estudios previos han determinado la capacidad antibacteriana de materiales en pruebas que se realizan en contacto directo (Stuart *et al.* 1991, Bystrom *et al.* 1985), o bien en difusión de agar (Basrani *et al.* 2003, Morrier *et al.* 2003, Barbosa *et al.* 1997) también en estudios "in vivo" donde se realiza una toma de muestra directamente del conducto sin asegurarse de incluir alguna superficie de túbulos dentinales que pudieran estar contaminados (Ercan *et al.* 2004), esto podría ser una variable que esté produciendo resultados falsos negativos por lo que no fue utilizado.

La toma de muestra de los túbulos dentinales se realizó con una fresa Peeso Largo #5, debido a que recolecta partículas de dentina a 300 μm circunferencialmente del conducto, y en estudios previos se ha determinado que la bacteria *E. faecalis*, puede penetrar entre 300 a 400 μm dentro de los túbulos dentinales en un periodo de 1-3 semanas sin diferencias significativas en los resultados (Saleh *et al.* 2004, Haapasalo & Orstavik 1987, Heling & Chandler 1996).

Otros estudios con metodologías similares, obtienen los resultados por CFU's o turbidimetría, pero no realizan la identificación bacteriana para determinar la presencia o ausencia de contaminación, lo cual debe aplicarse como criterio de exclusión del trabajo (Buck *et al.* 2001, Lynne *et al.* 2003), por el contrario otros estudios si verifican la pureza e identificación del *E. faecalis* produciendo resultados más confiables (Saleh *et al.* 2004, Lenet *et al.* 2000, Shipper *et al.* 2004).

Estudios basados en el mismo modelo antibacteriano usado en este trabajo, presentan ausencia de controles (Gomes *et al.* 2003), o bien usan otros tratamientos como control (Saleh *et al.* 2004). Es posible aplicar controles fiables, debido a que son muy importantes, cuando los estudios basan los resultados en mediciones por turbidez del medio, ya que encontramos que el control negativo, produce una turbidez basal al ser depositadas las partículas de dentina dentro del medio de TSB.

Soluciones irrigantes

En los resultados se observó que 10.8 mL de hipoclorito de sodio al 1% irrigados en 6 momentos, reduce la carga bacteriana significativamente (0.116) en comparación con el control positivo (0.185) ($p > 0.01$), pero cuando se agrega una aplicación pasiva de hipoclorito al 6% por 5 minutos reduce la carga

bacteriana a resultados sin crecimiento bacteriano (0.014) comparable con el control negativo ($p > 0.01$).

La colocación de una aplicación final de hipoclorito al 6% por 5 minutos logró evitar el crecimiento y eliminó las bacterias dentro de los túbulos dentinales, estos datos concuerdan con Piccolomini *et al.* (2002), quienes reportaron que el 100% de las bacterias habían muerto en un enjuague de hipoclorito al 5.25% por 15 minutos, Gomes *et al.* (2001) reporta que en contacto directo, el crecimiento del *E. faecalis* inhibido con hipoclorito al 5.25% por 30 segundos. Nuestros datos, confirman los resultados y proponen que con 5 minutos como colocación final al 6% son suficientes para encontrar ausencia de crecimiento en el modelo experimental de túbulos dentinales infectados.

Torabinejad *et al.* (2003), Siqueira *et al.* (2000), y los autores de la presente investigación está de acuerdo con que el poder antibacteriano del hipoclorito de sodio es mayor en cuanto aumente la concentración del mismo.

Medicamentos intraconducto

Nuestros resultados no encontraron capacidad antibacteriana significativa contra el *Enterococcus faecalis* en túbulos dentinales con dos semanas de infección ($p > .01$) en la medición de la densidad óptica. El rango de turbidez varió considerablemente (0.077 - 0.31) lo que indica que en algunos especímenes hubo mayor inhibición que en otros, o bien, la inoculación no se dio de forma igual para todas las muestras, eso se verifica en el control positivo (sin tratamiento antibacteriano) donde el rango varió de 0.143 a 0.301, demostrando que la inoculación no se comporta igual para todas las muestras.

Los resultados coinciden con los descritos por Saleh *et al.* (2004), que encuentran que el hidróxido de calcio no elimina totalmente el *Enterococcus faecalis* en un modelo similar, y coincidentemente la desviación estándar más alta de ellos al igual que nosotros aparentemente fue para el grupo de hidróxido de calcio. Estos autores mencionan que "la aplicación de hidróxido de calcio por 7 días reduce la carga bacteriana pero no es efectiva en la eliminación total del *E. faecalis* en túbulos dentinales infectados". Nuestros resultados no demuestran lo mencionado por los autores, debido a que al no haber diferencia significativa entre el control positivo y el de hidróxido de calcio, no catalogamos que el hidróxido de calcio reduce la carga bacteriana, pero, en que no es efectiva contra el *E. faecalis* no existe oposición. La diferencia entre resultados entre estudios puede darse en la resistencia a antibióticos, el porcentaje de resistencia a antibióticos, el estrés bacteriano sufrido durante la investigación y la posible mutación que dicha bacteria halla podido sufrir, influya directamente en los resultados del estudio.

Muchos estudios han mencionado la sobrevivencia, eliminación o inhibición del *E. faecalis* y otras bacterias en presencia de hidróxido de calcio, eso se debe a una falla metodológica en donde el pH es la variable protagonista.

Reportes del hidróxido de calcio mezclado con agua destilada, solución salina y glicerina, en el modelo de difusión en el agar, muestran que las mezclas son inefectivas en la inhibición del crecimiento de bacterias anaerobias y facultativas (Basrani *et al.* 2003, Morrier *et al.* 2003, Barbosa *et al.* 1997), una explicación a estos resultados se deben a que los medios de cultivo pueden contener en su composición sustancias amortiguadoras que se combinan con el alto pH del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y termina en un pH insuficiente en la inhibición microbiana (Siquiera & Lopes 1999). Otros reportes, demuestran que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ tiene efectos antibacterianos efectivos cuando son probados en contacto directo (Stuart *et al.* 1991, Bystrom *et al.* 1985), pero el contacto directo y los resultados obtenidos en estos trabajos no son extrapolables clínicamente (Siquiera & Lopes 1999).

Los estudios en tubulos dentinales infectados demuestran que el hidróxido de calcio, no es efectivo para eliminar el *Enterococcus faecalis*, y se ha encontrado que necesita más de 10 días para que esto suceda (Orstavik & Haapasalo 1990). Otros estudios mencionan que en 7 días el hidróxido de calcio no tiene efecto contra el *Enterococcus faecalis* cuando se encuentra dentro de los túbulos dentinales, no esteriliza la dentina ni previene la reinfección (Heling *et al.* 1992, Siquiera & Uzeda 1996). Los resultados se basan en la explicación de que las bacterias colonizan los tejidos en ramificaciones, istmos e irregularidades, que ayudan a la protección de la acción del hidróxido de calcio. Otra explicación es que existe una resistencia intrínseca a los medicamentos, un efecto amortiguador del pH por la acción buffer de la dentina, la baja solubilidad y difundibilidad del hidróxido de calcio por los túbulos dentinales, la activación de una bomba de protones específica por la bacteria, un sistema de enzimas específicas, un dispositivo amortiguador que prácticamente permite mantener el pH interno constante y una barrera física de las bacterias (Siquiera & Lopes 1999).

Los resultados obtenidos determinaron la susceptibilidad del *E. faecalis* a la clorhexidina en gel al 2% al no encontrarse diferencia significativa con el control negativo (0.023 vs 0.021 con $p > 0.01$) pero si con el hidróxido de calcio y el control positivo ($p < 0.01$). Lo que indica la efectividad de esta para actuar como un medicamento intraconducto por 7 días en la desinfección de los túbulos dentinales contaminados. Cuando se usa a concentraciones menores (0.12%), el medicamento no inhibe totalmente el *E. faecalis* (Lynne *et al.* 2003, Sassone *et al.* 2003). Sassone *et al.* (2003) reportan que "de acuerdo con los resultados, se concluye que la solución de clorhexidina debe usarse a concentraciones mayores a 0.12% para obtener un espectro antibacteriano", si tomamos en cuenta que el método que se utilizó en ese trabajo, fue por contacto directo, con más razón clínicamente debe usarse a concentraciones mayores. De la misma forma la clorhexidina al 2% en gel a demostrado actuar efectivamente contra el *E. faecalis*, donde se encontraron cultivos negativos en periodos de 1, 2, 7 y 15 días

(Gomes *et al.* 2003). Otros estudios reafirman los resultados (Vianna *et al.* 2004, Basrani *et al.* 2003, Gomes *et al.* 2001, Lenet *et al.* 2000), de hecho se ha llegado a mencionar que la clorhexidina en gel al 2% en dientes medicados por una semana tiene un efecto antibacterial residual contra el *E. faecalis* (Basrani *et al.* 2002).

La capacidad de este compuesto para eliminar fácilmente al *E. faecalis* es porque la clorhexidina es un agente catiónico (grupo bisgüanida; radical 4-clorofenil) y esa naturaleza catiónica, promueve conexiones con compuestos aniónicos de la superficie de la bacteria (grupos fosfatos del ácido teicoico de las bacterias gram negativas y de los lipopolisacáridos de las bacterias gram positivas) capaz de alterar su integridad. Los iones de fosfato, son la primera sustancia en aparecer dentro de la membrana citoplasmática dañada. La alteración de la membrana citoplasmática ya permeable promueve la precipitación de proteínas citoplasmáticas, alteran el balance osmótico celular, interfiere con el metabolismo, crecimiento, división celular, inhibición de la ATPasa membranal e inhibe el proceso anaerobio (Estrela *et al.* 2003).

Sistemas de obturación

El cemento de óxido de zinc y eugenol (formula de Grossman), es uno de los cementos más estudiados en endodoncia y cuando se compara con otros cementos de uso común, este sellador es quien dispone de la capacidad antibacteriana mayor (Abdulkader *et al.* 1996, Kaplan *et al.* 1999, Fuss *et al.* 2000, Lai *et al.* 2001, Mickel *et al.* 2003). Nuestros resultados concuerdan con los ya mencionados. En este estudio se comparó un sistema de obturación convencional que es la combinación de gutapercha con cemento de ZnOE, contra un sistema que está siendo introducido en el mercado por Resilon Research y Pentron, para el sistema de obturación Epiphany, que se compone de la punta que contiene Resilon y el cemento Epiphany de resina.

El cemento con la formula de Grossman se ha presentado como el de mayor capacidad antibacteriana en comparación con otros selladores como el Roeko, Apexit y Ketac-Endo (Saleh *et al.* 2004), datos que concuerdan con los obtenidos en la presente investigación, donde el cemento de óxido de zinc y eugenol (SILCO, San Luis Potosí, Mex), no presentó diferencia significativa con el control negativo ($p > 0.01$), pero si con el Resilon y Epiphany y el control positivo ($p < 0.01$).

La capacidad antibacteriana se explica por la liberaciones de iones de eugenol y Zinc tanto del cemento como de la gutapercha y que ingresa dentro de los túbulos dentinales (Saleh *et al.* 2004). Por su parte el ZnO tiene la función de actuar como agente antimicrobiano y sirve de citoprotector a las células tisulares (Sunzel *et al.* 1997). Así mismo se menciona que la gutapercha tiene capacidad antibacteriana y se le atribuye a la presencia de óxido de zinc (del 37% al 75%), pero puede variar debido a que los componentes son diferentes según las casas comerciales (Gurgel-Filho

et al. 2003). Además otra característica se debe a una explicación mecánica, que se basa, en hacer un medio, privado de nutrientes y espacio para la multiplicación (Saleh et al 2004).

Para Resilon y Epiphany, los datos reportan que en 300 µm de túbulos dentinales infectados con *E. faecalis*, este material cuenta con capacidad antibacteriana muy limitada.

Dentro de los componentes que podrían funcionar como antimicrobiano del cemento de resina Epiphany se encuentra el hidróxido de calcio, que se encuentra en cantidades ínfimas, y si este es liberado no se considera que produzca efecto alguno por las ya mencionadas razones de la acción del hidróxido de calcio ante el *E. faecalis* en tejido dentinal.

A pesar que no presentó diferencia significativa con el control positivo de 7 días de incubación ($p > 0.01$), se observa que la columna de medición de densidad óptica es menor que este, lo cual se explica porque la obturación por sí sola produce un medio, privado de nutrientes y espacio para la multiplicación bacteriana (Saleh et al 2004).

Bibliografía

1. Abdulkader A, Duguid R, Saunders EM. The antimicrobial activity of endodontic sealers to anaerobic bacteria. *Int Endod J.* 1996 Jul;29(4):280-3.
2. Al-Holy M, Lin M, Rasco B. Destruction of *Listeria monocytogenes* in sturgeon (*Acipenser transmontanus*) caviar by a combination of nisin with chemical antimicrobials or moderate heat. *J Food Prot.* 2005 Mar;68(3):512-20.
3. Al-Kilani MG, Whitworth JM, Dummer PM. Preliminary in vitro evaluation of Carisolv as a root canal irrigant. *Int Endod J.* 2003 Jun;36(6):433-40.
4. Baker NE, Liewehr FR, Buxton TB, Joyce AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide, iodine potassium iodide, betadine, and betadine scrub with and without surfactant against *E. faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Sep;98(3):359-64.
5. Barbosa CA, Goncalves RB, Siqueira Junior JF, De Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endod.* 1997 May;23(5):297-300.
6. Barthel CR, Moshonov J, Shuping G, Orstavik D. Bacterial leakage versus dye leakage in obturated root canals. *Int Endod J.* 1999 Sep;32(5):370-5.
7. Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, Lawrence HP, Friedman S. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Aug;94(2):240-5.
8. Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Nov;96(5):618-24.
9. Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J Endod.* 2001 Mar;27(3):206-8.
10. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985 Oct;1(5):170-5.
11. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983 Mar;55(3):307-12.
12. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effects of 0.5% sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg* 1981;89:321-328.
13. Crebelli R, Conti L, Monarca S, Feretti D, Zerbini I, Zani C, Veschetti E, Cutilli D, Ottaviani M. Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater. *Water Res.* 2005 Mar;39(6):1105-13.
14. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod.* 2004 Feb;30(2):84-7.
15. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;2:113-117.
16. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J.* 2003;14(1):58-62.
17. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Jr O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995;6:85-90.
18. Fuss Z, Charniaque O, Pilo R, Weiss E. Effect of various mixing ratios on antibacterial properties and hardness of endodontic sealers. *J Endod.* 2000 Sep;26(9):519-22.
19. Fuss Z, Mizrahi A, Lin S, Cherniak O, Weiss EI. A laboratory study of the effect of calcium hydroxide mixed with iodine or electrophoretically activated copper on bacterial viability in dentinal tubules. *Int Endod J.* 2002 Jun;35(6):522-6.
20. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium

- hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2001 Sep;34(6):424-8.
21. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*. 2003 Apr;36(4):267-75.
 22. Grandini S, Balleri P, Ferrari M. Evaluation of Glyde File Prep in combination with sodium hypochlorite as a root canal irrigant. *J Endod*. 2002 Apr;28(4):300-3.
 23. Gurgel-Filho ED, Andrade Feitosa JP, Teixeira FB, Monteiro de Paula RC, Araujo Silva JB, Souza-Filho FJ. Chemical and X-ray analyses of five brands of dental gutta-percha cone. *Int Endod J*. 2003 Apr;36(4):302-7.
 24. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66: 1375-9.
 25. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int Endod J*. 2003 Mar;36(3):147-60.
 26. Heling I, Chandler NP. The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers. *J Endod*. 1996 May;22(5):257-9.
 27. Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 1988;15:415-424.
 28. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9.
 29. Kaplan AE, Picca M, Gonzalez MI, Macchi RL, Molgatini SL. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. *Endod Dent Traumatol*. 1999 Feb;15(1):42-5.
 30. Koshy G, Corbet EF, Ishikawa I. A full-mouth disinfection approach to nonsurgical periodontal therapy--prevention of reinfection from bacterial reservoirs. *Periodontol 2000*. 2004;36:166-78.
 31. Lai CC, Huang FM, Yang HW, Chan Y, Huang MS, Chou MY, Chang YC. Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens. *Clin Oral Investig*. 2001 Dec;5(4):236-9.
 32. Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, *et al*. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod* 2000;26(11):652-5.
 33. Lindskog S, Pierce AM, Blomlof L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol*. 1998 Aug;14(4):186-90.
 34. Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, McPherson JC. In vitro antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. *J Endod*. 2003 Mar;29(3):187-90.
 35. Mickel AK, Nguyen TH, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2003 Apr;29(4):257-8.
 36. Mora JR. Resilon (RMS) al frente de la batalla de la obturación endodóntica. *Dentista Empresario* 2005;8(1):12-6.
 37. Morrier JJ, Benay G, Hartmann C, Barsotti O. Antimicrobial activity of Ca(OH)₂ dental cements: an in vitro study. *J Endod*. 2003 Jan;29(1):51-4.
 38. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod*. 2004 Nov;30(11):778-81.
 39. Nair PNR. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000*;1997;13:121-48.
 40. Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*. 1993 Jun;19(6):302-6.
 41. Oguntebi BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. *Int Endod J*. 1994 Jul;27(4):218-22.
 42. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. 1990 Aug;6(4):142-9.
 43. Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*. 2000 Jan;33(1):28-36.
 44. Piccolomini R, D'Arcangelo C, D'Ercole S, Catamo G, Schiaffino G, De Fazio P. Bacteriologic evaluation of the effect of Nd:YAG laser irradiation in experimental infected root canals. *J Endod*. 2002 Apr;28(4):276-8.
 45. Rolla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975;54:57-62.
 46. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Orstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *Int Endod J*. 2004 Mar;37(3):193-8.
 47. Santos S, Herrera D, Lopez E, O'Connor A, Gonzalez I, Sanz M. A randomized clinical trial on the short-term clinical and microbiological effects of the adjunctive use of a 0.05% chlorhexidine mouth rinse for patients in supportive periodontal care. *J Clin Periodontol*. 2004 Jan;31(1):45-51.
 48. Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Braz Dent J*. 2003;14(2):99-102.
 49. Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am*. 1967 Nov;12:723-44.
 50. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-contaminated root canals

- of extracted human teeth. *J Endod.* 2003 Sep;29(9):576-9.
51. Shipper G, Orstavik D, Teixeira FB, Trope M. An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material (Resilon). *J Endod.* 2004 May;30(5):342-7.
52. Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, Trope M. Periapical Inflammation after Coronal Microbial Inoculation of Dog Roots Filled with Gutta-Percha or Resilon. *J Endod.* 2005 Feb;31(2):91-96.
53. Siqueira JF Jr., Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endodon* 1996; 22: 674-6.
54. Siqueira Junior JF, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2000 Jun;26(6):331-4.
55. Siquiera JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999;32:361-369.
56. Spanó JCE, Barbin EL, Santos TC, Guimarães LF, Pécora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. *Braz Dent J* 2001;12:154-157.
57. Stuart KG, Miller CH, Brown CE Jr, Newton CW. The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 Jul;72(1):101-4.
58. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jan;85(1):86-93.
59. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Oct;78(4):522-30.
60. Sunzel B, Soderberg TA, Johansson A, Hallmans G, Gref R. The protective effect of zinc on rosin and resin acid toxicity in human polymorphonuclear leukocytes and human gingival fibroblasts in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1997 Oct;37(1):20-8.
61. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod.* 2003 Jun;29(6):400-3.
62. Turner SR, Love RM, Lyons KM. An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *Int Endod J.* 2004 Oct;37(10):664-71.
63. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dental Traumatol* 1993;9:243-248.
64. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):79-84.
65. Wuerch RM, Apicella MJ, Mines P, Yancich PJ, Pashley DH. Effect of 2% chlorhexidine gel as an intracanal medication on the apical seal of the root-canal system. *J Endod.* 2004 Nov;30(11):788-91.