



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Uso de la Terapia Fotodinámica y el
Chitosán en Endodoncia**

D^a. Encarnación Julián Belmonte

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Fabio Camacho Alonso, Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Uso de la terapia fotodinámica y el quitosán en endodoncia", realizada por D^a. Encarnación Julián Belmonte, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 17 de Enero de 2017



D. Yolanda Martínez Beneyto, Profesora Contratado Doctor Fijo de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Uso de la terapia fotodinámica y quitosán en endodoncia "; realizada por D^a. Encarnación Julián Belmonte, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de enero de 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mis padres su ayuda, comprensión y sobre todo su apoyo, ya que sin ellos no hubiera podido llevar a cabo no solo este proyecto sino todo lo que he hecho en mi vida a nivel académico, profesional y personal.

Gracias a ti también David que siempre has estado junto a mi y me has apoyado siendo un pilar más en mi vida.

Y por último gracias a mis directores Prof. Dr. Fabio Camacho Alonso y Prof. Dr. Yolanda Martínez Beneyto por la gran ayuda y dedicación no solo en la realización de este proyecto sino también a lo largo de mi carrera tanto académica como profesional.

Y a Prof. Dr Fernando Chiva, quién me enseñó a hacer mis primeras endodoncias lo que me hizo querer seguir creciendo en este campo. Muchas gracias por su inestimable ayuda en mi carrera y aporte en esta investigación.

Gracias a todos vosotros este bonito proyecto ha podido salir adelante.

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ALA: ácido 5- aminolevulínico.

BHI: caldo de cultivo cerebro-corazón.

°C: grados centígrados.

C.albicans: Candida albicans.

cel/ml: células/mililitro.

CHX: clorhexidina.

DT: desviación típica.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

E.fecaelis: Enterococcus fecaelis.

Fs: fotosensibilizante.

FDA: Administración de alimentos y medicamentos.

FDD: Factor de dilución decimal.

g/ml: gramo/mililitro.

h: hora.

ICG: verde indocianina.

J/cm²: julio/centímetro cuadrado.

KHZ: kiloherzios.

KTP: Potasio fosfato de titanio.

Log₁₀: logaritmo de 10.

LT: longitud de trabajo.

LTAPP: plasma a baja temperatura a presión atmosférica.

MEB: microscopio electrónico de barrido.

mg: miligramos.

mg/kg: miligramo/kilogramo.

mg/l: miligramos/litro.

mg/ml: miligramo/mililitro.

mm: milímetros.

ms: milisegundos.

MTAD: mezcla de tetraciclina, ácido cítrico y detergente.

mtermoporfina: THPC.

mW: milivatio.

NaOCl: hipoclorito de sodio.

nm: nanómetros.

O₂: oxígeno.

O₃: ozono.

p: p-valor.

PAA: periodontitis apical aguda.

P.acnes: Propionobacterium acnés.

P.endodontalis: Porphyromonas endodontalis.

P.gingivalis: Porphyromonas gingivalis.

PMCF: paramanoclorofenol alcanforado.

Rpm: revoluciones por minuto.

TAP: triple pasta antibiótica.

TFD: Terapia fotodinámica.

UFC: unidades formadoras de colonias.

UFC/ml: Unidades formadoras de colonias/mililitro.

VPH: virus del papiloma humano.

µm: micrómetro.

RESUMEN

Existen diferentes sustancias antimicrobianas empleadas en odontología como fuente de eliminación de ciertos microorganismos especialmente *Enterococcus faecalis*, microorganismo muy resistente en infecciones de conducto radicular. El objetivo de nuestro estudio ha sido evaluar la eficacia antibacteriana de la terapia fotodinámica (TFD) y el quitosán, contra el *E.faecalis* y estudiar el posible efecto potenciador del quitosán sobre el FS azul de metileno en dientes humanos extraídos experimentalmente infectados, tratados con TFD. Para ello se tomaron 102 dientes unirradiculares humanos, que se dividieron en seis grupos de 17 muestras cada uno. Se les realizó un tratamiento endodóntico, y posteriormente se les inoculó *E.fecaelis* en el interior de los conductos radiculares a todos los grupos de estudio y tras 48h de incubación se aplicaron las diferentes terapias (hipoclorito sódico al 2.5%, TFD, quitosán y TFD+quitosán) a su grupo correspondiente. Mediante este proceso se realizó la cuantificación de UFC/ml. Tras esto fueron deshidratados con etanol a diferentes concentraciones y cortados con un disco metálico de forma longitudinal y fijados para su posterior observación con el microscopio electrónico de barrido (MEB) cuyas imágenes obtenidas se analizaron con el sistema MIP4, para posteriormente ser analizadas y determinar el porcentaje de contaminación de cada uno de los tercios radiculares. Los resultados pusieron de manifiesto una gran reducción en los niveles de *E.fecaelis* de los conductos radiculares en los cuatro grupos que recibieron el tratamiento antibacteriano, respecto al grupo control, pero sin diferencias significativas entre los grupos de estudio. El azul de toluidina como agente fotosensibilizante junto con la terapia fotodinámica presentan acción antibacteriana. Los resultados de nuestro estudio coinciden con la literatura con respecto al poder desinfectante de la terapia fotodinámica frente el *E. faecalis*.

Como conclusión destacar que la mayor reducción de UFC/ml se obtuvo al combinar la TFD con quitosán por lo que el quitosán puede ser un polisacárido natural con efecto potenciador del fotosensibilizador azul de metileno en el tratamiento endodóntico de TFD contra *E. faecalis*. Además la combinación de TFD + quitosán produce una mayor reducción sobre la contaminación bacteriana y el barrillo dentinario en los canales radiculares de dientes humanos previamente infectados con *E. faecalis*, siendo más efectivo que el uso individualizado de TFD o quitosán, e incluso que la aplicación del irrigador más frecuentemente utilizado en endodoncia como es el hipoclorito sódico al 2,5%.

SUMMARY

There are different antimicrobial substances used in dentistry as a source of elimination of certain microorganisms, especially *Enterococcus faecalis*, a very resistant microorganism in root canal infections. The objective of our study was to evaluate the antibacterial efficacy of photodynamic therapy (PDT) and chitosan against *E.faecalis* and to study the possible potentiating effect of chitosan on methylene blue FS in experimentally infected human teeth treated with TFD. For this, 102 human unirradicular teeth were taken, which were divided into six groups of 17 samples each. Endodontic treatment was performed, and *E.fecaelis* was then inoculated into the root canals to all study groups and after 48h of incubation the different therapies were applied (sodium hypochlorite 2.5%, PDT, chitosan and PDT + Chitosan) to their corresponding group. Through this process the quantification of CFU / ml was performed. After this, they were dehydrated with ethanol at different concentrations and cut with a metal disk in a longitudinal way and fixed for later observation with scanning electron microscopy (SEM). The obtained images were analyzed with the MIP4 system, for further analysis and determination of the percentage of contamination of each of the root thirds. The results showed a large reduction in *E.fecaelis* levels of the root canals in the four groups receiving the antibacterial treatment, compared to the control group, but without significant differences between the study groups. Toluidine blue as photosensitizer agent with the photodynamic therapy present antibacterial action. The results of our study coincide with the literature regarding the disinfecting power of photodynamic therapy against *E. faecalis*.

In conclusion, the greatest reduction of CFU / ml was obtained by combining PDT with chitosan, so that chitosan may be a natural polysaccharide with the effect of the methylene blue photosensitizer in the endodontic treatment of PDT against *E. faecalis*. In addition, the combination of PDT + chitosan produces a greater reduction on bacterial contamination and dentin barrel in the root canals of human teeth previously infected with *E. faecalis*, being more effective than the individualized use of PDT or chitosan, and even that the application of the irrigator most frequently used in endodontics such as 2.5% sodium hypochlorite.

INDICE

I. Introducción	1
I.1 La lesión pulpar	1
I.2 El proceso infeccioso	3
I.2.1 Microorganismos e infección	4
I.2.2 Infecciones extrarradiculares	5
I.2.3 Bacterias resistentes	5
I.2.4 Factores de virulencia	5
I.2.5 Biofilms bacterianos	7
I.2.5.1 Desarrollo del biofilm	8
I.2.5.2 Biofilms endodónticos	9
I.2.5.3 Biofilms intracanal	9
I.2.5.4 Biofilms extrarradiculares	9
I.2.5.5 Biofilms periapicales	10

I.2.5.6 Biofilms por biomateriales	10
I.2.6 Enterococcus faecalis	10
I.3 Desinfección del conducto	11
I.3.1 Soluciones irrigadoras	12
I.3.2 Dispositivos irrigadores	19
I.3.3 Medicación intraconducto	21
I.4 Terapia fotodinámica	25
I.4.1 Mecanismos de acción	25
I.4.2 Fotosensibilizantes	27
I.4.3 Campos de actuación	29
I.4.4 Contraindicaciones y efectos adversos	35
I.5 Chitosán	35
I.5.1 Actividad antibacteriana	36
I.5.2 Campos de actuación de chitosán	37

II. Justificación y objetivos	40
III. Material y métodos	44
IV. Resultados	60
V. Discusión	83
VI. Conclusiones	92
VII. Referencias bibliográficas	94
VIII. Anexos	117

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La lesión pulpar

La endodoncia es la ciencia que tiene por objeto el estudio de la estructura, la morfología, la fisiología y la patología de la pulpa dental y de los tejidos perirradiculares y así como de su tratamiento (Canalda y Brau, 2006).

La pulpa dental es un tejido conectivo compuesta por una capa exterior, que a su vez constituye la capa interna de la dentina, conformada por los odontoblastos; y debajo de ésta se encuentra la capa acelular, rica en terminaciones nerviosas sensitivas y capilares sanguíneos. Las agresiones a la misma bien por caries o traumatismos, desencadenan a lo largo del tiempo diferentes patologías (Velasquez y cols., 2010). La caries dental es una infección localizada, destructiva y progresiva de la dentina que en su evolución puede ocasionar necrosis pulpar y la potencial pérdida del diente como causa de los microorganismos que participan en ella. Los productos tóxicos, enzimáticos y metabólicos generados por las bacterias se diseminan por el líquido dentinario y alcanzan la pulpa antes que los propios microorganismos. De esta forma provoca un cuadro inflamatorio por medio de la liberación de endotoxinas, las cuales pueden penetrar en la dentina por difusión con o sin presión hidrostática y son escasamente neutralizadas por los anticuerpos pudiendo desencadenar reacciones inmunitarias específicas e inespecíficas (Pumarola y cols., 2006).

En primer lugar puede desencadenar una pulpitis reversible en la que la pulpa se encuentra vital pero inflamada (con predominio crónico), y con capacidad de repararse una vez que se elimine el factor irritante. Los cambios inflamatorios que se dan en esta etapa son: vasodilatación, congestión, estasia, trombosis, aglomeración de leucocitos dentro de los vasos sanguíneos, edema, ruptura de los vasos y hemorragia local. Si la pulpitis reversible progresa y no se trata se originará una pulpitis irreversible en la que la pulpa se encuentra vital, inflamada, pero sin capacidad de recuperación, aún cuando se hayan eliminado los estímulos externos que provocan el estado inflamatorio. En este caso las bacterias han alcanzado la pulpa donde se asientan y establecen formas sintomáticas y asintomáticas de este tipo de pulpitis. La flora microbiana presente en la pulpitis irreversible asintomática, de respiración aerobia y anaerobia facultativa,

fundamentalmente se va transformando en un medio de respiración anaerobia estricta, lo que dificulta los procesos fagocíticos, facilitando así el desarrollo y la multiplicación microbiana, especialmente de bacterias anaerobias, potenciados por simbiosis y sinergismos microbianos. Las bacterias gram negativas anaerobias estrictas tienen una elevada capacidad proteolítica y colagenolítica, por lo que contribuyen en gran medida a la desestructuración del tejido conjuntivo pulpar, que si continúa en el tiempo da lugar a una necrosis pulpar que se define como una descomposición séptica o no del tejido conjuntivo pulpar que cursa con la destrucción del sistema microvascular y linfático de las células y, en última instancia, de las fibras nerviosas. Se observa un drenaje insuficiente de los líquidos inflamatorios debido a la falta de circulación colateral y la rigidez de las paredes de la dentina, originando un aumento de la presión de los tejidos y dando lugar a una destrucción progresiva hasta que toda la pulpa se necrosa. Cuando esto ocurre, el crecimiento bacteriano se mantiene dentro del conducto y sus productos metabólicos se extienden al periápice originando así la enfermedad periapical (Velásquez y cols., 2010); una lesión inflamatoria a nivel local que afecta a los tejidos que rodean la porción apical de la raíz dental (Yuichiro y cols., 2002; Pumarola y cols., 2006; Garcez y cols., 2008; Singh y cols., 2011). Se clasifica en periodontitis apical sintomática o aguda (PAA), definida como una inflamación aguda en los tejidos periapicales acompañada de síntomas clínicos como dolor que puede estar causada por la infección primaria como resultado de la necrosis pulpar (Nuringa y cols., 2010) y periodontitis apical crónica si la anterior progresa dando lugar a la aparición de un estoma o fístula con un débil equilibrio huésped-hospedador en el periápice (Schulz y cols., 2009) con síntomas clínicos mínimos o nulos (Canalda y cols., 2010 y Selcuk y cols., 2013). Durante este proceso se origina la reabsorción del hueso periodontal que si se mantiene en el tiempo puede desembocar en la pérdida de la pieza dental (Graunaite y cols., 2011).

I.2. El proceso infeccioso

Los dientes actúan como barreras mecánicas defensivas impidiendo la invasión microbiana de la pulpa. Aún así, las bacterias pueden utilizar diversos mecanismos para llegar a la cavidad pulpar como son (Pumarola y cols., 2006):

- *Túbulos dentinarios*: Las bacterias acceden a la cámara pulpar cuando la distancia que les separa de misma es de 0,2 mm (Dahlen y Moller, 1991).
- *Exposición directa*: Por trauma, fractura o por iatrogenia.
- *Ligamento periodontal*: Los microorganismos presentes en el surco gingival pueden alcanzar el sistema radicular de conductos a través de un canal lateral o a través del ápice. Esta migración es bastante común en pacientes periodontalmente comprometidos.
- *Anacoresis*: Los microorganismos son transportados hasta los conductos debido a un trauma o a una cirugía produciendo así una inflamación con ausencia de exposición pulpar. Esta invasión puede darse a cabo sin que hubiera habido sintomatología previa.
- *Saliva*: Diferentes investigaciones han revelado que las bacterias presentes en la saliva pueden invadir el sistema radicular de conductos a través de una restauración defectuosa (Torabinejad y Ung, 1990). Es muy importante, por tanto, restaurar y sellar la cámara pulpar después de un tratamiento de conductos.
- *Exposición directa*: Por trauma, fractura o por iatrogenia.
- *Contigüidad*: Puede existir cierto grado de migración de microorganismos a través de los tejidos de un diente afectado a uno adyacente sano.

I.2.1 Microorganismos e infección.

- **Infecciones intrarradiculares**

En las infecciones endodónticas podemos aislar diversos microorganismos (Lakshmi y cols., 2010):

a) Bacilos anaerobios Gram negativos: Estas bacterias se han reclasificado en dos géneros: sacarolítica (*Prevotella*) y asacarolíticas (*Porphyromonas*), (Shah y Collins, 1990).

- *Prevotella* (*Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella multissacharivorax*, *Prevotella baroniae* y *Prevotella denticola*).
- *Porphyromonas* (*Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis*.)

b) *Tannerella forsythia* (primer patógeno periodontal encontrado en infecciones endodónticas),

c) *Fusobacterium* (*Fusobacterium nucleatum* y *Fusobacterium periodonticum*)

d) Espiroquetas (*Treponema denticola*, *Treponema sacranskii*, *Treponema parvum*, *Treponema maltophilum* y *Treponema lecithinolyticum*).

e) Anaerobios Gram positivos como *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Filifactor alocis*, *Actinomyces spp.*, *Propionibacterium propionicum*, *Olsenella spp.*, *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* y *Eubacterium spp.*

f) Cocos Gram positivos como *Streptococcus spp.* (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitisi*, *Streptococcus sanguinis*) y *Enterococcus faecalis*.

g) Bacilos Gram positivos anaerobios como *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Filifactor alocis*, *Actinomyces spp.*, *Olsenella spp.*, *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum*, *Propionibacterium propionicum*, *Eubacterium spp.*

- Y otras especies bacterianas como *Campylobacter spp.* (*Campylobacter rectus* y *Campylobacter gracilis*), *Catonella morbic*, *Veillonella parvula*, *Eikenella*

corrodens, *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Granulicatella adiacens*, *Veillonella párvula*, *Neisseria*, *Centipeda periodontii*, *Gemella morbillorum*, *Bifidobacterium dentium*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Corynebacterium matruchotii*.

I.2.2. Infecciones extrarradiculares

Ocurren cuando los patógenos avanzan a través del sistema de conductos y causan una infección extraradicular la cual puede desencadenar el desarrollo de un absceso con inflamación de la zona periapical. Las infecciones extrarradiculares pueden estar relacionadas o no con patógenos provenientes del sistema de conductos. Los microorganismos presentes dominantes en este tipo de lesión son bacterias anaerobias (Tronstad y cols., 1987; Sunde y cols., 2000; Gatti y cols., 2000; Sunde y cols., 2002) como *Actinomyces spp*, *Propionibacterium propionicum*, *Treponema spp*, *Prevotella spp*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema forsythia*.

I.2.3. Bacterias resistentes

Algunas bacterias pueden persistir después del tratamiento endodóntico:

- Bacilos: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella spp*, *Campylobacter rectus*.

- Gram negativas: Streptococci (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus oralis*). *Lactobacilli*. *Staphylococci*. *E. faecalis*. *Olsenella uli*. *Pseudoramibacter alactolyticus*. *Propionibacterium spp*. *Actinomyces spp*. *Bifidobacterium spp*. *Eubacterium spp*. *Parvimonas micra*.

I.2.4. Factores de virulencia

La mayoría de microorganismos hallados en conductos radiculares infectados son comensales habituales, que han conseguido entrar en contacto con el tejido pulpar, normalmente, a través de una lesión por caries. Algunos de los factores de virulencia que pueden tener un papel importante en infecciones endodónticas son los siguientes:

-Lipopolisacáridos: También conocidos como endotoxinas (Schein y Schilder, 1975). El lipopolisacárido es una parte integral de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Cuando esta se libera se produce en la pulpa una movilización de los mecanismos de vigilancia inmunológica. Las endotoxinas relacionadas con este proceso están involucradas en la inflamación periapical, la activación del complemento y la destrucción del hueso periapical (Dwyer y Torabinejad, 1980; Horiba y cols., 1992; Khabbaz y cols., 2001; Jacinto y cols., 2005).

-Ácido lipoteicoico: Se encuentra en la pared celular de las bacterias Gram positivas, formado por ácido teicoico y lípidos (Hogg y cols., 1997). La patogenicidad de este ácido asemeja a la de los lipopolisacáridos (Cohen, 2001). El ácido se libera en la lisis celular y se une a células diana, las cuales interactúan con los anticuerpos activando así la cascada del complemento.

-Fimbrias: Son macromoléculas largas, filamentosas, se encuentran en la superficie de muchas bacterias Gram negativas. Sus proyecciones, están hechas de subunidades de proteínas. Las fimbrias están implicadas en la unión e interacción con otras bacterias. (Tang y cols., 2004).

-Peptidoglicanos: Son los componentes principales de la pared celular de las bacterias Gram positivas. Tras la lisis celular, los peptidoglicanos son liberados y pueden hacer reaccionar al sistema inmune, así como inducir la regulación de células inflamatorias y citoquinas (Wang y cols., 2000). Los peptidoglicanos pueden facilitar una respuesta inmune adaptativa a través de los macrófagos (Myhre y cols., 2006). El efecto de los peptidoglicanos es potenciado en presencia de lipopolisacáridos (Wang y cols., 2001).

-Cápsulas: Su función es la de proteger a la bacteria frente a la fagocitosis, virus bacterianos y materiales tóxicos hidrófobos. Bacterias y hongos se hacen valer de estas cápsulas para eludir la activación del sistema de complemento.

-Vesículas extracelulares: Producidas por bacterias Gram negativas, permiten la liberación de sus contenidos en el medio ambiente extracelular. Las vesículas contienen proteínas y lípidos responsables de la hemaglutinación, adhesión bacteriana, hemólisis y actividades proteolíticas (Kinder y cols., 1989). Las bacterias se sirven de estas vesículas extracelulares para interactuar con células procarióticas y eucarióticas además

de regular la interacción entre bacterias cercanas (Beveridge, 1999; Kuehn y Kesty, 2005).

-Proteínas extracelulares: Producidas por bacterias, estas enzimas son liberadas durante la lisis celular bacteriana contribuyendo a la propagación de la infección a través de la neutralización de inmunoglobulinas y componentes del sistema de complemento. (Sundqvist y cols., 1985).

-Ácidos grasos: Estos elementos son los subproductos de la fermentación que llevan a cabo las bacterias anaerobias obligatorias, e incluyen ácido butírico y ácido propiónico. Estos ácidos estimulan la respuesta inflamatoria y la liberación de citoquinas inflamatorias que contribuyen al proceso de infección. (Niederman y cols., 1997; Kurita-Ochiai y cols., 2006).

-Poliaminas: Son moléculas pequeñas que contribuyen a los síntomas clínicos como el dolor y la formación de fístula (Maita y cols., 1990).

Existe por tanto, una relación directa entre los factores de virulencia y los signos y síntomas clínicos en la enfermedad periapical, aunque, se conocen otros mecanismos por los cuales las bacterias también pueden modular el proceso infeccioso como la capacidad de algunas bacterias intracelulares de inactivar a los fagocitos, consiguiendo así, evitar ser destruidas por macrófagos y neutrófilos (Jansen y Yu, 2006). Algunas bacterias pueden variar genéticamente sus antígenos de superficie, lo que confunde al sistema inmune a la hora de atacar a estos organismos (Frank y Barbour, 2006). Una comprensión profunda de estos factores de virulencia nos ayuda a identificar los objetivos terapéuticos en infecciones endodónticas.

I.2.5. Biofilms bacterianos

La capacidad de los microorganismos para agruparse es un hecho esencial para su supervivencia en cualquier ambiente, de hecho la gran mayoría crecen y desarrollan sus funciones metabólicamente integrados como miembros de comunidades (biofilms) (Cohen y cols., 2011). El biofilm puede definirse como una comunidad de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza (Lasa y cols., 2005).

El biofilm que se localiza en la estructura dental puede alcanzar hasta 300 o más capas celulares de espesor. Estas microcolonias pueden estar formadas por un único tipo bacteriano, pero en la mayoría de casos suelen ser comunidades mixtas. Las microcolonias formadas en la superficie del biofilm surgen de la colonización de bacterias planctónicas, es decir no unidas. Durante las primeras etapas de la formación del biofilm las bacterias se unen a numerosas proteínas del huésped y se coagregan con otras bacterias. Estas interacciones conducen a cambios en la tasa de crecimiento, la expresión génica y la producción de proteínas adoptando así fenotipos radicalmente distintos a los de sus homólogas planctónicas (Cohen y cols., 2011).

I.2.5.1 Desarrollo del biofilm

Las bacterias pueden formar el biofilm en cualquier superficie que esté bañada por un fluido que contenga nutrientes. Los componentes principales en la formación de biofilms son células bacterianas, una superficie sólida y un medio fluido.

La formación de biofilms se produce en diferentes fases:

- Adsorción de moléculas orgánicas e inorgánicas a la superficie sólida y formación de la capa de acondicionado.

- Adhesión de las células microbianas a la capa de acondicionado. Diferentes factores afectan a dicha unión tales como el pH, temperatura, disponibilidad nutricional, tiempo de contacto, hidrofobicidad de la superficie. Durante este proceso, la bacteria se adhiere a la superficie del sustrato mediante fimbrias, pili, flagelos y polisacáridos extracelulares (glicocalix). Este tipo de adherencia inicial no es específica y se da debido a una atracción electrostática para producir una adherencia posterior, esta vez sí, específica, entre la bacteria y el sustrato gracias a la adhesina en la superficie de la bacteria.

- En esta etapa se produce una atracción de colonizadores secundarios a la monocapa, los cuales forman microcolonias, dando lugar a la estructura final del biofilm (Cowan y cols., 1987; Costerton y cols., 1999;).

I.2.5.2 Biofilms endodónticos

La evolución de la infección altera el ambiente del canal volviéndolo más anaeróbico. Estos cambios dentro del canal hacen que la supervivencia dentro del mismo sea difícil para los microorganismos supervivientes. Aun así, una esterilización completa del canal es casi imposible de conseguir debido a la persistencia de los patógenos y a la complejidad anatómica del sistema de conductos radiculares.

Los biofilms bacterianos en endodoncia se pueden clasificar de la siguiente forma:

- Biofilms intracanal.
- Biofilms extrarradiculares.
- Biofilms periapicales.
- Biofilms por biomaterial.

I.2.5.3 Biofilms intracanal

Identificados por primera vez por Nair en 1987. Son biopelículas microbianas formadas en la dentina del canal radicular de un diente infectado (Nair, 2000). La invasión del sistema radicular de conductos, incluyendo los tubulillos dentinarios, está delimitada a bacterias con las características necesarias para sobrevivir en dicho ambiente tales como, *Propionibacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Peptostreptococcus* y *Veillonella spp* (Love y cols., 2004).

I.2.5.4 Biofilms extrarradiculares

También se denominan biofilms de superficie de raíz. Se forman en el cemento de superficie de la raíz adyacente al ápice de dientes endodónticamente infectados (Frank y cols., 2006).

Los biofilms extrarradiculares están relacionados con periodontitis apicales asintomáticas y con abscesos apicales crónicos con fístulas. A veces, el biofilm extrarradicular se calcifica y se asocia con inflamación periapical y un retraso en la cicatrización a la espera de ser resuelto de forma de ortógrada (Harn y cols., 1998).

I.2.5.5 Biofilms periapicales

Son biofilms aislados que se encuentran en la región periapical de los dientes endodóticamente infectados. Pueden o no, ser dependientes del conducto radicular. Estos microorganismos tienen la capacidad de superar los mecanismos de defensa del huésped, prosperar en el tejido periapical inflamado y posteriormente inducir una infección periapical (Hornef y cols., 2002).

I.2.5.6 Biofilms por biomaterial

Se forma cuando las bacterias se adhieren a la superficie del biomaterial artificial creando un biofilm. (Wilson, 1996). En endodoncia, los biofilms se forman en materiales de obturación en el conducto radicular. Estos biofilms pueden ser intrarradiculares o extrarradiculares dependiendo de si el material de obturación se encuentra dentro del canal o se ha extruido más allá del ápice.

I.2.6. *Enterococcus faecalis*

El género *Enterococcus* engloba un conjunto de especies morfológicamente semejantes a los estreptococos. Causan infecciones muy diversas y poseen un creciente interés en el caso de los procesos oportunistas. Se asocian en parejas y cadenas cortas y aunque su hábitat natural es el intestino, se han podido aislar a veces como microbiota normal en la mucosa bucal y dorso de la lengua. También se han descrito su presencia en infecciones pulpo-periapicales y en bolsas periodontales (Liébana y cols., 2002)

Es un microorganismo anaerobio facultativo gram positivo que raras veces se encuentra en grandes cantidades en las infecciones endodólicas primarias, pero que está fuertemente asociado con los fracasos endodólicos (77%) y con las periodontitis apicales crónicas (50% de los casos) (Fimple y cols., 2008; Pagonis y cols., 2010; Pavaskar y cols., 2014). Aunque la temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de este microorganismo es de 35°C, se ha observado su crecimiento también entre 10°C y 45°C. Todas las cepas pueden crecer en medios que contengan esculina, la cual hidrolizan en presencia de sales biliares al 40% (medio agar bilis-esculina). Casi todas las cepas son homofermentativas, siendo el ácido láctico el producto final principal de la fermentación de la glucosa, no producen gas y no contienen enzimas citocrómicas

(Facklam y cols., 1999 y Portenier y cols., 2003). El *E. faecalis* tiene una pared celular con antígenos del grupo D, constituidos por ácido lipoteicoico que se encuentra asociado a la membrana citoplasmática de la bacteria y que contiene residuos de glicerol. Además, posee gran cantidad de mureina y ácido teicoico (Portenier y cols., 2003). Presenta un alto grado de supervivencia al no depender totalmente de sus factores de virulencia (enzimas líticas, citolisinas, sustancias de agregación, feromonas). Es capaz de suprimir la acción defensiva de los linfocitos, contribuyendo al fracaso de la endodoncia, y puede permanecer en el interior del conducto radicular a pesar de la existencia de condiciones extremas, debido a su elevada capacidad de invasión y de unión a las fibras de colágena. Se une fuertemente a la dentina tubular mediante la producción de la enzima convertidora de angiotensina, promotora de dicha unión, y la serin proteasa (Stuart y cols., 2006 y Halkai y cols., 2014). Además es capaz de formar “biofilms” en la superficie dentinaria que lo hacen mil veces más resistente a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos (Stuart y cols., 2006).

Es resistente al hidróxido de calcio usado frecuentemente como medicación intraconducto, ya que mantiene su pH debido a la capacidad tampón de su citoplasma y formación de una bomba de protones (Stuart y cols., 2006)

Por tanto el desarrollo de estrategias terapéuticas antibacterianas es muy importante para poder eliminar la totalidad de microorganismos presentes en los conductos radiculares (Singh y cols., 2011); en especial aquellos que presentan resistencias a los productos antibacterianos utilizados en la actualidad.

I.3. Desinfección del conducto

La complejidad del sistema de conductos radiculares hace que un completo desbridamiento y eliminación de dichas bacterias mediante la instrumentación e irrigación o mediante la colocación de una medicación intraconducto (antibióticos o antisépticos)(Garcez y cols., 2008), sea prácticamente imposible (Singh y cols., 2011), pudiendo así en el momento de la obturación radicular quedar gran cantidad de bacterias remanentes (perceptible en el 50% de los casos)(Pagonis y cols., 2010 y Xu y cols., 2009), que puede llevar al fracaso del tratamiento (Stuart y cols., 2006).

La presencia de “barrillo dentinario” no solo reduce la eficacia de las sustancias irrigadoras y de la medicación intraconducto en la desinfección del conducto sino que mantiene presencia de gérmenes en el interior del mismo. Los fracasos de los tratamientos endodónticos están asociados a abundantes cantidades de microorganismos aeróbicos Gram positivos y facultativos, mientras que en las infecciones primarias predominan los anaerobios estrictos (Pagonis y cols., 2010). El tipo de microorganismo presente en el conducto influye en la tasa de éxito del tratamiento, siendo menor si se trata de Gram positivos (68%), mientras que para los Gram negativos aumenta hasta un 98% (Garcez y cols., 2008).

Uno de los principales objetivos del tratamiento endodóntico es limpiar y desinfectar los conductos radiculares para eliminar el tejido infectado y los restos inorgánicos del conducto radicular. Dependiendo de la sustancia empleada para ello se obtendrán unas propiedades bactericidas y de disolución de tejidos adicionales (Navarro y cols., 2010 y Bhuvu y cols., 2010).

I.3.1. Soluciones irrigadoras

Existen diversas sustancias que se usan para irrigar los conductos radiculares durante el tratamiento endodóntico; que se pueden clasificar en:

➤ **Alcalis**

- **Hipoclorito de sodio (NaOCl):** Presentado por primera vez como agente blanqueador, las soluciones de hipoclorito fueron ganando una amplia aceptación como desinfectantes a finales del siglo XIX basándose en los estudios de laboratorio de Koch y Pasteur (Mohammadi y cols., 2008). En la Primera Guerra Mundial, Henry Drysdale Dakin y Alexis Carrel extendieron el uso de una solución al 0,5% de hipoclorito de sodio para la irrigación de heridas infectadas, basados en los estudios meticulosos de Dakin sobre la eficacia de diferentes soluciones en los tejidos necróticos infectados (Dakin, 1915).

Además de su amplio espectro y la eficacia de eliminar microbios no específicos, las preparaciones de hipoclorito son a la vez esporicidas y

virucidas y también tienen un efecto disolvente sobre los tejidos necróticos en vez de sobre los tejidos vitales (Austin y Taylor, 1918; Valera y cols., 2009). Además es efectivo para todas las formas de *E. faecalis* incluyendo su presencia como biofilm (Bhuva y cols, 2010).

Estas características, llevaron al NaOCl acuoso a ser usado como irrigante principal en endodoncia a principios de 1920 (Grossman, 1943; Zhender y cols., 2003).

Siempre ha existido controversia sobre qué concentración es la más eficaz y menos tóxica de las soluciones de hipoclorito para ser utilizada en endodoncia. La solución original de Dakin (0,5% NaOCl) fue diseñada para tratar heridas abiertas, se supuso, que en un área confinada como es el sistema de conductos, las concentraciones debían ser más altas para obtener una mayor eficiencia que la solución original de Dakin (Grossman, 1943). La eficacia antibacteriana y la capacidad de disolución de los tejidos del hipoclorito acuoso está directamente ligada a su concentración, pero también lo está su toxicidad (Spangberg y cols., 1973; Khademi y cols., 2007). Se ha demostrado que a concentraciones de 5,25% el hipoclorito es capaz de irritar los tejidos perirradiculares cuando por accidente se extravasa durante la irrigación endodóntica (Hulsmann y Hahn, 2000). Otro de los inconvenientes del hipoclorito a una concentración de 5,25%, es que disminuye significativamente el módulo de elasticidad y resistencia a la flexión de la dentina en comparación con una solución salina, mientras que a una concentración al 0,5% no (Sim y cols., 2001); esto es debido a la acción proteolítica del hipoclorito concentrado sobre la matriz de colágeno de la dentina.

Otro enfoque para mejorar la eficacia del hipoclorito en el tratamiento de conductos es la de aumentar la temperatura de la solución de NaOCl de baja concentración. Esto mejora su capacidad de disolución de tejido (Abou-Rass y Oglesby, 1981). Además, las soluciones de hipoclorito calentadas eliminan los residuos orgánicos dentinarios de manera más eficiente. El aumento de la temperatura de NaOCl en 5 grados, duplica su actividad (Cunningham y Balekjian, 1980).

A pesar de ser un irrigante muy eficaz no es capaz de eliminar completamente el barrillo dentinario, por lo que se ha recomendado su combinación con otros agentes para mejorar la limpieza y desinfección de aquellas zonas de difícil acceso, como son los conductos laterales o túbulos accesorios (Cohen y cols., 2011 y Miliani y cols., 2012).

➤ **Agentes antibacterianos**

- **Clorhexidina (CHX):** es un agente antimicrobiano de amplio espectro eficaz contra bacterias gram-negativas y gram-positivas. Posee un componente molecular catiónico que se une a las zonas cargadas negativamente de la membrana celular de los microorganismos, induciéndoles la lisis celular. Durante muchos años se ha usado en tratamientos preventivos y periodontales como enjuague bucal para prevenir la aparición de placa (Cohen y cols., 2011). Resulta efectiva en infecciones secundarias a procedimientos quirúrgicos orales, y en el mantenimiento de la salud de los tejidos peri-implantarios. Así mismo reduce la cantidad de bacterias después de la manipulación dental y también se emplea en el tratamiento de aftas recurrentes y estomatitis como consecuencia del uso de dentaduras removibles.

La clorhexidina está especialmente indicada en ciertos grupos de riesgo de la población, como las personas con ortodoncia, los discapacitados y los pacientes deprimidos inmunológicamente (Podbielski y cols., 2003). Actualmente se está usando como irrigante endodóntico por su sustantividad y su actividad antibacteriana de larga duración, tanto en forma de gel como de líquido, a una concentración del 2% (Stuart y cols., 2006; Cohen y cols., 2011 y Miliani y cols., 2012). Se ha demostrado que es eficaz para reducir o eliminar completamente los microorganismos del conducto y de los túbulos dentinarios y es bien tolerada por el tejido conectivo periapical.

La CHX es activa frente a una amplia gama de microorganismos, tales como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), levaduras y hongos. Cuando se utiliza como un medicamento intracanal, la CHX es más eficaz que el Ca(OH)_2 contra la

infección por *E. faecalis* en túbulos de la dentina (Almyrouwi y cols., 2002; Basrani y cols., 2003; Gomes y cols., 2009). Ferraz y cols. mostró que el gel de CHX al 2% tiene varias ventajas sobre la solución de CHX al 2%, a pesar de tener propiedades similares antimicrobianas, de sustantividad y biocompatibilidad (Ferraz y cols., 2001 y Ferraz y cols., 2007). Por tanto, el uso de gel de la CHX como medicamento intracanal se recomienda para un corto período de tiempo (3-5 días), en particular en aquellos casos en que los canales se preparan, pero no pudieron ser obturados por falta de tiempo. También se recomienda su uso en casos de exudación, ya que conserva su actividad antimicrobiana en presencia de sangre y otros materias orgánicas (Foulkes, 1973).

- **Acetato de bis-dequalinio:** se ha usado como sustancia irrigadora por ser un buen desinfectante, con baja toxicidad, baja tensión superficial y acción quelante (Canalda y cols., 2006).

➤ Oxidantes

- **Peróxido de hidrógeno:** se ha utilizado como un irrigante endodóntico durante años, principalmente en concentraciones que oscilan entre el 3% y 5%. Es activo frente a bacterias, virus y levaduras (Cohen y cols., 2011). Los radicales libres hidroxilo actúan sobre las proteínas y el ADN bacterianos y al entrar en contacto con los tejidos orgánicos en combinación con el hipoclorito de sodio, se desprenden burbujas de oxígeno que colaboran en la eliminación mecánica de los restos hísticos del conducto y tienen un efecto antibacteriano sobre los anaerobios (Cohen y cols., 2011; Canalda y cols., 2006).

➤ Quelantes

- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA):** también se utiliza en la irrigación de conductos, y aunque tiene escasa actividad antibacteriana, es importante por su capacidad de eliminar los restos inorgánicos permitiendo

así un mejor acceso de otras sustancias irrigantes a los túbulos dentinarios (Stuart y cols., 2006). A pesar de ello, no puede eliminar completamente la capa de barrillo dentinario del conducto, y es necesario combinarlo con otro agente irrigador como es el hipoclorito sódico para eliminar los restos orgánicos. El EDTA generalmente se emplea a una concentración del 17 % pudiendo eliminar los restos dentinarios en menos de un minuto cuando está en contacto directo con la pared del conducto radicular. Además de su capacidad de limpieza, los agentes quelantes pueden desprender el biofilm adherido en las paredes del conducto, lo que explica como el EDTA puede reducir la cantidad de microorganismos presentes en el mismo pese a tener una capacidad antiséptica limitada (Coehn y cols., 2011; Miliani y cols., 2012)

➤ **Ácidos**

- **Ácido cítrico** empleado al 10% de forma individual elimina el barrillo dentinario pero como en el caso del EDTA, tiene escasa acción antibacteriana. Sin embargo una solución de 0,1% de benzoato de sodio añadido a ácido cítrico al 10% podría aumentar su poder bactericida (Stuart y cols., 2006).

- **MTAD:** Es un nuevo irrigante que consiste en la mezcla de un antibiótico (doxiciclina), un ácido (ácido cítrico) y un detergente que presenta mayor poder antibacteriano que el EDTA y el ácido cítrico. Su eficacia se atribuye a su actividad anticlagenasa, su bajo pH, y su capacidad de ser liberado gradualmente en el tiempo (Stuart y cols., 2006), aunque no existe mucha información acerca de su mecanismo de acción exacto (Cohen y cols., 2011). Su efecto antibacteriano se atribuye principalmente a la doxiciclina, un isómero de la tetraciclina. Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro eficaces contra una amplia gama de microorganismos y ejercen su acción a través de la inhibición de la síntesis de proteínas. El otro componente del MTAD, el ácido cítrico, tiene una actividad antibacteriana limitada, pero puede aumentar el efecto antibacteriano de algunas sustancias por afectar

directamente a la membrana celular de la bacteria y además puede facilitar la penetración del MTAD en la dentina. Sin embargo también puede servir de nutriente para algunas bacteria e inactivar las propiedades antibacterianas de algunos agentes desinfectantes tales como CHX y la povidona yodada (Cohen y cols., 2011; Miliani y cols., 2012).

- **Ozono:** La terapia de oxígeno y ozono tiene una larga historia de investigación en aplicaciones clínicas y terapéuticas en seres humanos. La primera aplicación médica fue en 1870 cuando Lender purificó la sangre en tubos de ensayo (Azarpazhooh y Limeback, 2008; Stoll y cols., 2008 y Mohammadi y cols., 2013). El ozono (O_3), es una molécula triatómica de oxígeno con un peso molecular de 47,98 g / mol. Termodinámicamente es una molécula altamente inestable y se descompone en oxígeno puro (O_2) con una vida media corta en determinadas condiciones de temperatura y presión (Bocci, 2006). En el ámbito clínico, un generador de oxígeno / ozono simula un rayo a través de un campo de descarga eléctrica (Saini, 2011).

El gas ozono tiene un alto potencial de oxidación y es 1,5 veces más eficaz que el cloruro cuando se utiliza como agente antimicrobiano contra bacterias, virus, hongos y protozoos. También tiene la capacidad de aumentar la circulación de la sangre y regular positivamente la respuesta inmune (Mohammadi y cols., 2013).

El ozono se aplica a los tejidos orales en las siguientes formas: agua ozonizada, aceite de oliva ozonizado y gas oxígeno / ozono. El agua ozonizada y el aceite de oliva son los sistemas de suministro ideales ya que tienen la capacidad de atrapar y luego liberar oxígeno / ozono. Estas formas de aplicación se utilizan de forma individual o en combinación en el tratamiento de enfermedades dentales (Seidler y cols., 2008). En la práctica clínica de endodoncia, el ozono se ha utilizado en forma gaseosa ($4,2 \times 10^{-6}$ g m⁻³ HealOzone; KaVo, Biberach, Alemania) (Mohammadi y cols, 2013). La mayoría de los estudios sobre las aplicaciones del ozono en la endodoncia se han centrado en su actividad antimicrobiana. Nagayoshi y cols. encontraron que el agua ozonizada (0,5-4 mg / l) fue muy eficaz destruyendo microorganismos Gram-positivos y negativos (Nagayoshi y cols., 2004). Las bacterias Gram-

negativas, tales como *Porphyromonas endodontalis* (*P. endodontalis*) y *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), eran sustancialmente más sensibles al agua ozonizada que los estreptococos orales Gram positivos y *C. albicans* en cultivo puro (Siren y cols., 2004). La actividad antibacteriana del ozono gaseoso demostró que era mayor que el láser potasio fosfato de titanilo (KTP) y menos que el NaOCl (Kustarci y cols., 2009), por lo que, el uso de ozono en gas en los fluidos de irrigación puede ser útil como complemento para la desinfección en endodoncia (Case y cols., 2012).

Debido a la alta potencia oxidativa del ozono, la inhalación del mismo puede ser tóxico para el sistema pulmonar y otros órganos por lo que, todos los materiales que entran en contacto con el gas deben ser resistentes al ozono, tales como vidrio, silicio, y teflón (Mohammadi y cols., 2013).

El ozono mejora la cicatrización de heridas, ayuda en el tratamiento de caries de superficie en raíces expuestas. Por otra parte, parece que el ozono no tiene efecto adverso significativo sobre la adhesión dentinaria. A pesar de la poca frecuencia de efectos secundarios, la terapia de ozono puede causar complicaciones médicas graves, por lo tanto, se debe tener cuidado con su uso y manejo.

- **Propolis.** El propolis o propóleo es una sustancia resinosa que las abejas recogen de diversas plantas y lo usan para cubrir las paredes de la colmena, rellenar grietas o huecos, y embalsamar invasores. Se ha utilizado como un remedio en la medicina popular desde tiempos antiguos. La composición química del propolis es muy compleja e incluye compuestos orgánicos tales como compuestos fenólicos y ésteres, flavonoides en todas sus formas (flavonoles, flavonas, vonones flagrantes, dihidroflavonoles y chalconas), terpenos, beta-esteroides, aldehídos aromáticos y alcoholes, sesquiterpenos, estilbenos y terpenos (Viuda-Martos y cols., 2008). La composición química del propóleo es también muy variable y depende de la flora locales en el lugar de recolección (Bankova, 2005; Uzel y cols., 2005). El propóleo se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anti-inflamatorio, hepatoprotectoras, antioxidantes, antitumorales, y efectos inmunomoduladores (Viuda-Martos y cols., 2008; Bankova, 2005). Además de todas estas propiedades, se le ha

relacionado un efecto antibacteriano principalmente debido al contenido de flavonoides (Salomao y cols., 2004; Cushnie y Lamb, 2005). Los compuestos fenólicos, terpenos, ácidos y ésteres aromáticos también se ha asociado con sus propiedades antibacterianas (Marcucci y cols., 2001; Koo y cols., 2002; Bankova, 2005 y Popoya y cols., 2005).

I.3.2 Dispositivos irrigadores

Una limpieza eficaz del conducto radicular debe incluir la agitación intermitente del contenido del conducto para evitar que los residuos se acumulen en la parte apical del conducto radicular (Cohen y cols., 2011). Para ello podemos emplear diversas técnicas.

➤ **Técnica de activación manual.**

- **Irrigación pasiva:** consiste en depositar el irrigante mediante una jeringa con agujas de diversos calibres ya sea de forma pasiva o con agitación, introduciendo y retirando la aguja en el conducto radicular (Vera y cols., 2012). Las agujas Max I-Probe[®] (Dentsply, Auckland, Nueva Zelanda) presentan un extremo romo y cerrado con un orificio de salida lateral, para minimizar la posibilidad de extruir las soluciones al periápice. Han demostrado su efectividad para conseguir un elevado caudal de solución en la zona apical del conducto (Canalda y cols., 2006). De esta forma el irrigante se introduce en el interior del conducto y puede llegar a todas la partes del mismo si es agitado en su interior mediante movimientos de vaivén o corono-apicales con la aguja (Cohen y cols., 2011).
- **Irrigación manual dinámica:** consiste en el uso de un cono de gutapercha bien adaptado a un conducto previamente instrumentado con un movimiento hacia dentro y fuera del conducto de aproximadamente 2 mm, de esta forma se produce un efecto hidrodinámico y mejora el desplazamiento e intercambio de los irrigantes en la zona apical en comparación con la irrigación estática o pasiva (Vera y cols., 2012).

➤ **Técnicas de activación mecánica.** Actualmente se han desarrollado una serie de dispositivos para superar las limitaciones de la irrigación mediante la jeringa convencional como son:

- **Irrigación ultrasónica pasiva:** consiste en el empleo de una punta de ultrasonidos activada en el interior del conducto una vez que este se ha conformado (Bhuva y cols., 2010). Se han descrito tres técnicas de irrigación ultrasónica en la literatura. La primera combina la instrumentación y la irrigación ultrasónica simultáneamente. La segunda técnica, denominada irrigación pasiva ultrasónica opera sin instrumentación simultánea, dispensándose primero la solución irrigadora en el interior del conducto y, a continuación, se agita y activa con ultrasonidos. Una tercera forma consiste en la irrigación continua, en la que el irrigante se dispensa de forma continua mientras se agita. Los sistemas ultrasónicos y sónicos pueden facilitar la eliminación de los restos hísticos de la luz del conducto así como la limpieza de istmos o canales en forma de C mediante la transmisión acústica y penetrar los túbulos dentinarios o conductos laterales, logrando una desinfección más efectiva, siendo una opción importante en los casos de necrosis pulpar (Cohen, 2011 y Garcia y cols., 2013).
- **Irrigación sónica:** Tronstad (Tronstad y cols., 1985) fue el primero en reportar el uso de un instrumento sónico en endodoncia en 1985. La irrigación sónica es diferente de la ultrasónica pues opera a una frecuencia más baja (1-6 kHz); además, genera una mayor amplitud o un mayor movimiento hacia atrás y hacia adelante del movimiento de la punta, los patrones de oscilación son diferentes a los del sistema ultrasónico y el sistema sónico presenta una oscilación de la lima puramente longitudinal. Este tipo de vibración ha mostrado ser eficiente en la limpieza de los conductos radiculares. Un ejemplo de este tipo de sistemas es el Endo Activator® (Dentsply, Tulsa, EEUU) el cual consiste en una pieza de mano portátil con tres tipos de puntas de polímero desechables de diferentes tamaños. La punta vibradora en combinación con el movimiento hacia

dentro y hacia afuera del conducto radicular produce un fenómeno hidrodinámico (García y cols., 2013).

- **Irrigación mediante presión apical negativa:** constituye otro de los métodos empleados para la irrigación final del conducto. La irrigación se suministra a la cámara pulpar y una aguja muy fina conectada al dispositivo de succión de la unidad dental se coloca en el conducto radicular. Mediante este mecanismo el exceso de irrigante se transporta apicalmente desde la cavidad de acceso y es eliminado en última instancia a través de la aspiración. En primer lugar, una macrocánula elimina los restos presentes en el tercio coronal. Posteriormente, una microcánula elimina las partículas presentes cerca de la longitud de trabajo. Un ejemplo de estos dispositivos es el EndoVac[®] (SybronEndo, Mérida, México) que es un sistema que origina poca extrusión de residuos más allá del foramen y es efectivo para la irrigación final del conducto (Canalda y cols., 2006, Cohen y cols., 2011, García y cols., 2013).

La mayoría de los dispositivos consiguen una mejor limpieza que las clásicas agujas (Canalda y cols., 2006).

I.3.3 Medicación intraconducto

La colocación de un medicamento en el interior del conducto entre las sesiones de un tratamiento endodóntico contribuye de manera eficaz en la desinfección del conducto. Dicho medicamento debe ser efectivo durante todo su período de aplicación y penetrar en los túbulos de la dentina, para poder eliminar las bacterias que pueden estar presentes en su interior; además debe poseer poca toxicidad para los tejidos perirradiculares (Tandam y cols., 2014). Algunos de los medicamentos de uso común son:

- **Paramonoclorofenol alcanforado (PMCF):** El PMCF es uno de los antisépticos intraconducto más utilizados con un notable efecto antibacteriano pero también toxicidad sobre los tejidos vitales. Cuando se deposita en el interior de los conductos radiculares, su efecto no se limita a ellos, sino que, a

través del ápice, se ha demostrado su distribución sistémica, detectándose en sangre y en orina, ya que su baja tensión superficial puede facilitar su difusión a través de los túbulos dentinarios y de los conductos secundarios. La asociación del paramonoclorofenol con el alcanfor disminuye su efecto irritante hístico y desaparece en un 90% en las primeras 24 horas cuando se coloca impregnando un algodón en la cámara pulpar. (Kant y cols., 1974; Spangberg y cols., 1979; Soekanto y cols., 1996 y Llamas y cols., 1997).

- **Hidróxido de calcio:** se ha recomendado como medicación intraconducto debido a sus propiedades antibacterianas, antiabsortivas y disolventes de los restos tisulares basadas en su elevado pH. Se ha utilizado clínicamente para controlar el crecimiento microbiano, disolver los restos orgánicos, curar la inflamación periapical, detener la reabsorción radicular inflamatoria y estimular la formación de tejido duro. La utilización más frecuente y eficaz de hidróxido de calcio es una suspensión acuosa. A pesar de su buen efecto antimicrobiano, es difícil de manipular, y de distribuir a lo largo del conducto así como de eliminar completamente (Tandam y cols., 2014).

- **Clorhexidina:** También puede emplearse como medicación intraconducto (Canalda y cols., 2006), ya sea en forma de gel al 2% o en solución colocada en un dispositivo de liberación. La clorhexidina tiene una fuerte actividad antibacteriana frente a una amplia gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como levaduras, anaerobios facultativos y aerobios. Es particularmente eficaz contra el *Enterococcus faecalis*, principal implicado en el fracaso del tratamiento endodóntico y que es resistente al tratamiento con hidróxido de calcio. Las características más importantes de la clorhexidina son su unión a proteínas, su sustantividad, por lo que prolonga el período de actividad antibacteriana y su baja toxicidad (Tandam y cols., 2014). El uso de Clorhexidina en gel se recomienda para un corto período de tiempo (3-5 días), particularmente en aquellos casos donde los conductos fueron totalmente instrumentados, pero no pudieron ser obturados por falta de tiempo. También se recomienda en los casos de persistencia de exudados, ya que conserva su actividad antimicrobiana en presencia de sangre y otras materias orgánicas (Podbielski y cols., 2003).

➤ **Asociación de Clorhexidina e Hidróxido de calcio:** Estudios recientes han sugerido que la clorhexidina podría utilizarse en combinación con el hidróxido de calcio para mejorar la eficacia antimicrobiana contra microorganismos resistentes a este. El hidróxido de calcio combinado con clorhexidina al 0,5% es eficaz contra *Candida albicans* surgiendo como una alternativa terapéutica al uso individual del mismo. Y la mezcla de ambas pero con una concentración de la clorhexidina al 1% resulta eficaz contra *E.faecalis*. Asimismo el hidróxido de calcio también favorece las propiedades antibacterianas de la clorhexidina frente agentes patógenos como es el *Peptostreptococcus micros*, una bacteria gram positiva presente en las periodontitis apicales crónicas (Pobdielski y cols., 2003; Evans y cols., 200; Basrani y cols., 2004).

➤ **Antibióticos**

- **Triple pasta antibiótica (TAP):** contiene minociclina, metronidazol y ciprofloxacino. La minociclina inhibe la síntesis de proteínas en las superficies de los ribosomas lo que le proporciona su propiedad antifúngica; y metronidazol y ciprofloxacino que ayudan a los fibroblastos a la matriz extracelular y de colágeno. La TAP es capaz de penetrar en los túbulos dentinarios y es eficaz contra los microorganismos anaeróbicos, bacterias gram negativas y gram-positivas. Promueve la curación y reparación de tejidos periapicales creando un ambiente aséptico y acelerando el desarrollo funcional del complejo pulpo-dentinario. Sin embargo, se debe tener cuidado en pacientes alérgicos a la tetraciclina, y también cuando se use en los dientes anteriores, donde podría causar decoloraciones por la minociclina (Chua y cols., 2014).

- **Corticoesteroides + Antibióticos (Ortosporin):** se utiliza actualmente en Odontología como medicación intraconducto debido a sus componentes: sulfato de polimixina B, neomicina de sulfato, hidrocortisona y una base acuosa. Esta preparación reduce la vasodilatación, disminuye la exudación de líquido, y también presenta una acción vasoconstrictora a nivel capilar. Sin embargo, aunque esta combinación tiene muchas propiedades que son

deseables como medicación intraconducto, si se utiliza durante períodos prolongados puede reducir la actividad metabólica celular e incluso impedir o retrasar la reparación de tejidos (Ramos y cols., 2010).

- **Polimixina B:** es un antibiótico catiónico que actúa sobre las paredes celulares permeables de las bacterias gram negativas, causando su muerte. Más allá de su actividad antimicrobiana, la polimixina B también es capaz de neutralizar las endotoxinas liberadas por las bacterias y bloquear algunos efectos biológicos causados por éstas (Maekawa y cols., 2010).

- **Propóleo:** conocido por ser un antibiótico natural, es uno de los temas de investigación médica y dental actuales. El propóleo es una mezcla compleja de resina y sustancias balsámicas recogidas de algunas plantas por las abejas (*Apis mellifera*), que las modifican con la adición de secreciones propias, polen y cera. El propóleo contiene flavonoides que son su principal componente activo biológico, y responsables de sus propiedades terapéuticas. En odontología, se ha utilizado para el tratamiento de las úlceras aftosas, candidiasis, gingivitis necrosante aguda ulcerativa, gingivitis y periodontitis y posee actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* y diferentes microorganismos presentes en conductos de dientes no vitales. Otras propiedades de esta sustancia son su acción analgésica y también antiviral, antiprotozoaria, inmunoestimulante, antioxidante y antiinflamatoria (Ramos y cols., 2010).

- **Ledermix:** Posee un componente antibiótico (demeclociclina, que es un derivado de la tetraciclina) y un componente esteroideo (acetónido de triamcinolona) en su formulación estándar. Se utiliza como medicación intraconducto a medio y largo plazo debido a su acción antiinflamatoria y antibiótica siendo útil en el manejo de inflamaciones periapicales y reabsorciones radiculares. La presencia de componentes esteroideos hace que el dolor post-operatorio en el tratamiento de endodoncia disminuya y ejerce un efecto anticlástico en las células del huésped para prevenir la reabsorción radicular inflamatoria (Athanasiadis y cols., 2012).

- **Odontopasta:** Es una pasta con base de óxido de zinc, 5% de clorhidrato de clindamicina y 1% de acetato de triamcinolona. La clindamicina es eficaz

contra muchos patógenos endodónticos incluyendo estreptococos, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Propionobacterium*, *Microaerofilicos*, *Peptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Veillonella*. La pasta de clindamicina usada como medicación intraconducto tiene un buen efecto antibacteriano, sin embargo, no posee propiedades para evitar la reabsorción radicular. Este antibiótico proporciona una actividad bacteriostática, y actúa como un material de obturación provisional entre sesiones durante el tratamiento endodóntico para prevenir la repoblación bacteriana en el interior del conducto. El acetónido de triamcinolona puede reducir temporalmente la inflamación y el dolor postoperatorio y no se recomienda la mezcla de hidróxido de calcio adicional en una combinación 50:50 con esta sustancia porque el componente de esteroides se destruye inmediatamente por el aumento de la alcalinidad (Bansal y Jain, 2014).

I.4. Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica (TFD) fue desarrollada como una terapia frente al cáncer y consiste en la activación lumínica de un agente fotosensibilizante localizado en tejidos premalignos y malignos para generar oxígeno y radicales libres que son tóxicos para las células del tejido a tratar (Singh y cols., 2011). Su eficacia fue demostrada en 1920 cuando Oscar Raab refirió el efecto mortal que el hidrocloreuro de acridina tenía sobre el paramecio (*Paramecia caudatum*,) un tipo de protozoo ciliado presente en charcas de agua dulce (Pagonis y cols., 2010).

I.4.1. Mecanismos de acción

La terapia fotodinámica se fundamenta en la unión de un fotosensibilizador (sustancia fotoactivable) a una célula diana y su activación mediante una luz de una longitud de onda concreta. Tras la activación del fotosensibilizador se produce oxígeno y otras sustancias reactivas que actúan de forma citotóxica. Por si solos ni el fotosensibilizador ni la luz desencadenan efectos citotóxicos sobre las células

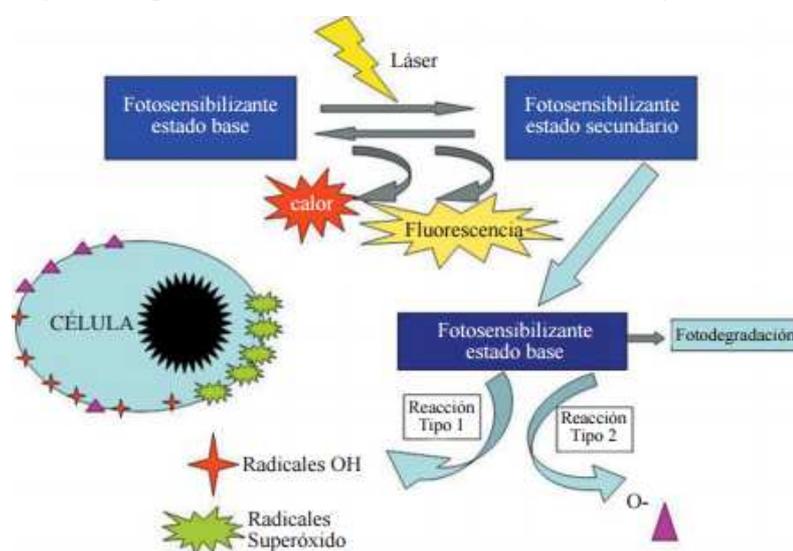
bacterianas (Sahm y cols., 2011), por tanto son necesarios 3 elementos para que se produzca la reacción fotodinámica: una molécula fotosensible, luz visible y oxígeno.

La acción bactericida de la TFD a nivel molecular puede explicarse mediante dos mecanismos potencialmente diferentes. Uno de ellos produce el daño sobre el ADN y el otro sobre la membrana citoplasmática de las células bacterianas (posiblemente el efecto antibacteriano principal). Tras la irradiación con luz láser, el fotosensibilizador pasa a un estado activado desde el cual puede reaccionar con las moléculas circundantes mediante dos vías (ver Figura 1).

En la primera vía se produce una reacción de transferencia de electrones entre el fotosensibilizador activado y las moléculas de las células circundantes, liberando radicales libres. Estos radicales libres son altamente reactivos e interaccionan con moléculas endógenas de oxígeno, originando derivados del oxígeno altamente reactivos como superóxidos, hidroxilos y peróxido de oxígeno, que alteran la integridad de las membranas celulares bacterianas causando daños biológicos irreversibles (Sahm y cols., 2011).

La segunda vía de reacción origina una interacción entre el fotosensibilizador y el oxígeno. El oxígeno reactivo resultante recibe el nombre de oxígeno singlete y su reactividad química le permite interactuar con un gran número de sustancias biológicas, desencadenando daños oxidativos y efectos letales en las bacterias por el daño producido en sus membranas (Sahm y cols., 2011).

Figura 1: Tipos de reacciones foto-oxidativas (De Ramírez y cols, 2007).



Ambas reacciones ocurren simultáneamente y en competición, sin embargo, parece que el oxígeno singlete es el mayor responsable del daño tisular producido durante la TFD.

Aunque la supervivencia del oxígeno singlete en los sistemas biológicos es muy corta (<0.4ms) y su radio de acción es muy limitado (0.02 micrómetros), los efectos citotóxicos de la terapia se producen principalmente por este tipo de oxígeno. Debido al reducido radio de migración el área de acción de la terapia fotodinámica se limita directamente a la localización del fotosensibilizante (Sahm y cols., 2011).

Este descubrimiento revolucionó el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas bacterianas y después también se ha extendido como tratamiento antifúngico, antiprotozoario y antipalúdicos (Kharkwal y cols., 2011).

I.4.2 Fotosensibilizantes

Un número limitado de bacterias produce de manera natural agentes fotosensibles endógenos, por lo que pueden ser eliminadas cuando se exponen a una luz láser de una longitud de onda adecuada. Sin embargo, la membrana exterior de las bacterias, y también de los hongos y virus, pueden ser teñidas sintéticamente para poder eliminarlas con luz láser (Mazariegos, 2008).

Los componentes fotosensibilizantes (FS) tienen una gran carga catiónica por lo que son fácilmente absorbidos y penetran en el interior de las bacterias, haciéndolos idóneos para eliminar este tipo de microorganismos (Garcez y cols., 2008). Las características que deben reunir los fotosensibilizantes son:

- Capacidad para localizarse específicamente en el tejido o células a tratar.
- Distribución homogénea en el tejido o célula diana.
- Alta lipofilia a fin de que penetren las barreras biológicas.
- Vida media corta y rápida eliminación en los tejidos no enfermos.
- Espacio de tiempo lo más breve posible entre la administración y la acumulación máxima en la diana a tratar.

- Activación frente a longitudes de onda determinadas.
- Penetración óptima en el tejido.
- Alto rendimiento en la producción de oxígeno reactivo monoatómico (singlete) o, en general, de especies reactivas de oxígeno.
- Ausencia de toxicidad en un ambiente oscuro.

La primera generación de fotosensibilizantes para uso clínico en TFD estuvo constituido por los derivados de la hematoporfirina de administración intravenosa, cuya principal desventaja era su lenta eliminación desde la piel, por lo que el paciente podía presentar reacciones de fotosensibilidad durante 6 a 10 semanas después del tratamiento, debiendo evitar la exposición al sol o a fuentes lumínicas artificiales potentes durante este período de tiempo.

La segunda generación de fotosensibilizantes surgió de la necesidad de desarrollar compuestos que tuvieran una absorción lumínica más allá de los 630 nm, incrementando en consecuencia la penetración tisular, la velocidad de eliminación desde el tejido y teniendo por tanto un efecto fotodinámico más profundo (Moreno y cols., 2007).

Durante la aplicación de la terapia fotodinámica, la luz excita el componente absorbido en el interior de la bacteria dentro del conducto radicular provocando la apoptosis celular, aunque también puede afectar a las células propias del tejido periapical que también hayan absorbido el compuesto fotoactivo (Xu y cols., 2009).

Entre los fotosensibilizadores más usados en la TFD encontramos el azul de toluidina, el azul de metileno, el violeta cristal, el verde malaquita y el ALA- ácido 5 aminolevulínico (Mazariegos, 2008).

El azul de toluidina es un agente eficaz en la inactivación de organismos patógenos tales como virus, bacterias y levaduras. En los últimos años se ha descrito como antifúngico y medicamento antibacteriano que actúa frente a algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas (Vaziri y cols., 2012).

El azul de metileno que se ha utilizado en la práctica médica desde hace cien años y recientemente ha sido aprobado por la FDA para su administración intravenosa

en el tratamiento de encefalopatías, metahemoglobinemia, urolitiasis y envenenamiento con cianuro en dosis mayores de 1 mg/kg , pudiendo ser prescrito en dosis orales de 65-130 mg, 3 veces al día, o en dosis únicas diarias de 100-300 mg (Hou y cols., 2012).

El verde malaquita (diaminotrifetilmetano N-metilado) es un colorante catiónico, que ha sido ampliamente utilizado para la tinción de cuero, lana y seda, papel, algodón, etc. Se emplea generalmente como antifúngico, antibacteriano y anti-parasitario en acuicultura. La potente actividad antimicrobiana de este fotosensibilizante se debe a la inhibición de enzimas intracelulares, la intercalación en el ADN, y / o interacción con las membranas celulares (Chen y cols., 2014).

El ácido 5-aminolevulínico (ALA), un derivado de la benzoporfirina, la texafirina, y la temoporfina (THPC) son fotosensibilizadores de segunda generación y por tanto poseen una mayor capacidad para generar oxígeno singlete (Rajesh y cols., 2011).

El violeta cristal o violeta de genciana es un colorante con estructura química de trifetilmetano, siendo muy eficaz en el tratamiento contra hongos (Mazariegos, 2008).

En la actualidad la actividad fotosensibilizante se logra mediante fuentes de luz diferentes, como el láser de helio-neón (663nm), láser de diodo de galio-arsénico-aluminio (630-690, 830 o 906nm) y el láser de argón (488-514 nm). Para la terapia fotodinámica no es necesario un láser de alto nivel, dado que los láseres de acción más suave como los mencionados alcanzan el efecto bactericida deseado (Sahm y cols., 2011).

I.4.3 Campos de actuación

➤ Campos de actuación en medicina

La mayor parte de la utilización de la terapia fotodinámica para el tratamiento de infecciones hasta ahora ha estado dirigida hacia lesiones virales. En los años 70 tuvo mucho auge en el tratamiento de herpes simple. Varios colorantes, sobre todo el rojo neutro, se aplicaron en lesiones de herpes orales o genitales, seguidos por fotoactivación con luz blanca. Sin embargo, esta práctica disminuyó después de que Myers y cols

(Hamblin y cols., 2012) realizaron un ensayo clínico controlado, que no mostró ningún efecto terapéutico y si un posible efecto adverso sobre lesiones orolabiales.

Actualmente el uso de la TFD en dermatología está teniendo un gran auge, sobretodo en el tratamiento de lesiones premalignas y malignas, de enfermedades inflamatorias e infecciosas y más recientemente en el tratamiento del acné. El *Propionobacterium acnes* (*P. acnes*) es el microorganismo más prevalente en la piel y en los folículos de las áreas ricas en glándulas sebáceas. La fotoactivación de las porfirinas bacterianas de este microorganismo conduce a la formación de oxígeno citotóxico que lleva finalmente a la muerte del *P. acnes*. La exposición de estas a la luz de 415 nm produce la absorción de fotones y la excitación fotodinámica de las porfirinas cuyo resultado final es la interrupción de la función normal de la pared celular bacteriana y la posterior muerte del microorganismo constituyendo por tanto una opción razonable para el tratamiento del acné vulgar (Moreno y cols., 2007).

La papilomatosis, causada por el virus del papiloma humano (VPH), ha sido tratada por vía sistémica y tópica con la TFD así como el Condiloma acuminado causado por VPH.

También ha resultado eficaz en el tratamiento de enfermedades parasitarias como la malaria (*Plasmodium falciparum*) y la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) (Hamblin y cols., 2004).

La TFD también puede considerarse como una opción de tratamiento en aquellos pacientes que presentan carcinomas recurrentes o tumores secundarios en faringe, laringe y esófago (Mohanty y cols., 2013). Un ejemplo serían los carcinomas basocelulares y nodulares en los que se obtiene un excelente resultado cosmético y terapéutico, con tasas de curación equiparables a las obtenidas con la cirugía (hasta de 91% vs 98% de cirugía). Sin embargo, la probabilidad de lograr el control local de carcinomas basocelulares tratados con TFD depende directamente del grosor o profundidad del tumor, los carcinomas basocelulares agresivos como el infiltrante y morfeiforme, los nodulares grandes y las recidivas no son opciones adecuadas a la TFD debido a la falta de penetración a planos más profundos del agente fotosensibilizante (Moreno y cols., 2007).

En neurocirugía los primeros estudios mostraron que la TFD con un fotosensibilizante (ALA) por vía oral (20 mg/kg/ peso) era eficaz en el tratamiento de algunos tumores cerebrales. La TFD en estos casos es coadyuvante de la cirugía; una vez extirpado quirúrgicamente el tumor se aplica el tratamiento en la cavidad resultante. Esta técnica combinada ha registrado una mejoría significativa de la supervivencia en la mayoría de los pacientes tratados. Asimismo, se emplea la TFD para establecer los límites periféricos de gliomas infiltrantes y es una técnica auxiliar en las resecciones precisas de estas regiones. También se ha utilizado la TFD en el tratamiento de astrocitomas anaplásicos, glioblastoma multiforme, observándose un aumento de la supervivencia por encima de los 36 meses en 63 y 25%, respectivamente (Moreno y cols., 2007).

En neumología la TFD ha sido empleada en el tratamiento paliativo del carcinoma broncogénico para el control del sangrado y la eliminación de la obstrucción de la vía aérea cuando el tumor no se puede extirpar. La TFD también puede usarse para tratar tumores muy pequeños en pacientes que no son candidatos a los tratamientos convencionales. En los últimos 25 años se ha utilizado la TFD exclusivamente en el tratamiento de lesiones iniciales y para desobstruir bronquios en tumores más avanzados. En la actualidad hay estudios en fase III (Moreno y cols., 2007).

En oftalmología se ha empleado la TFD con verdeporfina y luz roja de 689 nm en el tratamiento de la degeneración macular senil, donde se produce una neoformación vascular en la retina, responsable de la formación de cicatrices y pérdida de visión. El agente fotosensibilizante se localiza selectivamente en el tejido vascular neoformado y el objetivo del tratamiento es detener la progresión de la enfermedad y preservar la visión (Moreno y cols., 2007).

En urología se ha empleado el photoprin, un oligómero sódico derivado de la porfirina para TFD con irradiación transuretral e intravesical. La técnica se ha mostrado eficaz en el tratamiento del carcinoma superficial de vejiga refractario a tratamientos convencionales. Se ha empleado también en el cáncer de próstata y en la hiperplasia prostática benigna (Moreno y cols., 2007).

También se ha empleado la TFD en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana, ya que se ha visto que hay agentes fotosensibilizantes capaces de fijarse a las células del sarcoma de Kaposi (Moreno y cols., 2007).

Por último su efectividad también se ha observado en el tratamiento de las sinusitis crónicas como terapia alternativa o asociada al tratamiento médico utilizándose el azul de metileno como agente fotosensibilizante (Biel y cols., 2011).

➤ **Campos de actuación en odontología**

La utilización de la terapia fotodinámica en infecciones orales en el campo de la odontología ha alcanzado un gran auge en la actualidad, representando el crecimiento más significativo en el área de esta técnica a nivel de desinfección (Kharkwal y cols., 2011).

- **Enfermedad periodontal:** el tratamiento mediante esta terapia consiste en introducir el fotosensibilizante en el alveolo dental seguido del uso de luz mediante una fibra óptica, obteniendo resultados similares al tratamiento periodontal de raspado y alisado (Kharkwal y cols., 2011), y mejores si se emplea asociado con el tratamiento periodontal (Arweiler y cols., 2013). Este procedimiento es beneficioso en áreas de difícil acceso y en aquellas situaciones en las que se desee reducir el tiempo operatorio y el riesgo de bacteriemia. Se observó la eliminación completa de bacterias anaerobias como *Porphyromona gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Capnocytophaga gingivalis* tras el tratamiento con la terapia fotodinámica y una reducción de la actividad de algunos factores de virulencia como los lipopolisacáridos y las proteasas tras la terapia. También en animales se ha observado la reducción de patógenos periodontales y la disminución de la pérdida de hueso después del uso de la terapia fotodinámica (Balata y cols., 2013).
- **Caries:** en el caso específico de la caries, ha mostrado resultados prometedores en la inactivación de microorganismos cariogénicos presentes en el biofilm o la dentina cariada. Debido a la descontaminación inducida

por la TFD, se puede especular que la eliminación de caries por este medio se puede realizar de forma conservadora. Además, la TFD puede considerarse selectiva, es decir, ni el fotosensibilizador, ni la luz muestran propiedades bactericidas cuando se usan por separado. En consecuencia, la actividad antimicrobiana se consigue combinando el colorante con la luz de manera simultánea sin perturbar la flora en sitios distantes. Otro aspecto importante es su naturaleza atraumática, lo que podría estar indicado especialmente para pacientes con necesidades especiales y niños (Ricatto y cols., 2014).

- **Hongos:** la Candidiasis y la candidosis son las infecciones micóticas más comunes. Las especies de *Cándida* colonizan las superficies epiteliales del cuerpo en la mayoría de la población humana y son parte de la microbiota comensal de la cavidad oral. En los últimos años, la incidencia de estas infecciones fúngicas ha aumentado notablemente en los países desarrollados debido al uso generalizado de las prótesis dentales, xerostomía, y una mayor supervivencia de los pacientes con deficiencias inmunes. De forma que la candidiasis oral es una infección oportunista común en pacientes inmunocomprometidos, y la *Cándida albicans* es el agente etiológico principal de esta infección, que representa el 70-80% de los microorganismos aislados de las lesiones de la mucosa oral. Por tanto, el aumento de la incidencia de las infecciones por hongos, junto con su creciente resistencia a los agentes antifúngicos, han impulsado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas tales como el tratamiento tópico con la terapia fotodinámica que al parecer resulta efectiva contra ellas (Chabrier-Roselló y cols., 2005; Dennis y cols., 2011 y Camacho-Alonso y cols., 2016).
- La **Eritroplasia oral** y la **hiperplasia verrucosa oral** que presentan los potenciales de transformación maligna más altos entre todas las lesiones precancerosas, mostraron mejores resultados clínicos con esta terapia en aproximadamente el 66-95 % de los pacientes; sin embargo en el tratamiento de leucoplasias orales no ha mostrado resultados concluyentes (Marotti y cols., 2013).

- **Implantes:** en implantología esta técnica no solo se ha empleado en la descontaminación de la superficie del implante sino también en las periimplantitis que son la principal causa de fracaso de los implantes dentales. La periimplantitis es un proceso inflamatorio que afecta los tejidos que rodean al implante, la cual está asociada a la supuración, bolsas periodontales, y pérdida de hueso marginal. Aunque se han obtenido buenos resultados con la técnica fotodinámica pudiendo ser una alternativa de tratamiento efectiva como coadyuvante a los tratamientos convencionales en los casos con periimplantitis, su tratamiento sigue siendo un reto debido a su complejidad etiológica y patogénica. (Shoaib y cols., 2013).
- **Endodoncia:** en los últimos años se ha estado empleando con el objetivo de reducir los microorganismos presentes en el conducto radicular y los resultados observados tanto in vivo como in Vitro han demostrado que puede ser una alternativa efectiva para la desinfección de conductos (Fimple y cols., 2008; Xu y cols., 2009 y Singh y cols., 2011). En general el efecto de la terapia fotodinámica es más patente frente a microorganismos Gram positivos que ante Gram negativos; de ahí que sea idóneo para eliminar el *E. faecalis* (Vaziri y cols., 2012). Esta diferente sensibilidad a la terapia se debe a las diferentes estructuras que componen la membrana de estos dos grupos de bacterias. En las bacterias Gram positivas, la membrana citoplasmática está rodeada por una capa relativamente porosa de peptidoglicanos y ácido lipoteicoico que permite el paso del fotosensibilizante a su interior. Sin embargo, las Gram negativas poseen una membrana citoplasmática interna y una externa, separadas por peptidoglicanos de forma que constituye una barrera que impide la unión y la penetración de muchos agentes fotosensibilizadores (Kharkwal y cols., 2011). Hoy día se ha demostrado que puede ser una alternativa efectiva para la desinfección de conductos (Fimple y cols., 2008; Xu y cols., 2009 y Singh y cols., 2011), sobre todo en aquellos pacientes que presentan necrosis pulpar y lesiones periapicales (Fimple y cols., 2008). Puede combinarse con el desbridamiento habitual mecánico y productos químicos antimicrobianos como hipoclorito sódico y el peróxido de hidrógeno. Reduce significativamente los recuentos de *E. faecalis* en conductos radiculares infectados en comparación con los de instrumentación

e irrigación endodóntica tradicionales (Biel y cols., 2011). Garcez y cols (Garcez y cols., 2008) observaron un aumento de la tasa de éxito de un 98.37% en la reducción bacteriana con la TFD frente a un 82.5% obtenido con un método convencional.

- **Traumatismos:** las lesiones traumáticas, especialmente en los dientes anteriores, tienen una elevada prevalencia y son considerados problemas graves debido a la implicación de la pulpa en ellos. En este contexto la terapia fotodinámica como agente antibacteriano es un enfoque prometedor para la desinfección de las paredes dentinarias del conducto (De Sant Anna, 2014).

I.4.4. Contraindicaciones y efectos adversos.

La principal contraindicación formal de la TFD es la porfiria y la existencia de enfermedades hepáticas graves o cardiopatías inestables (Moreno y cols., 2007).

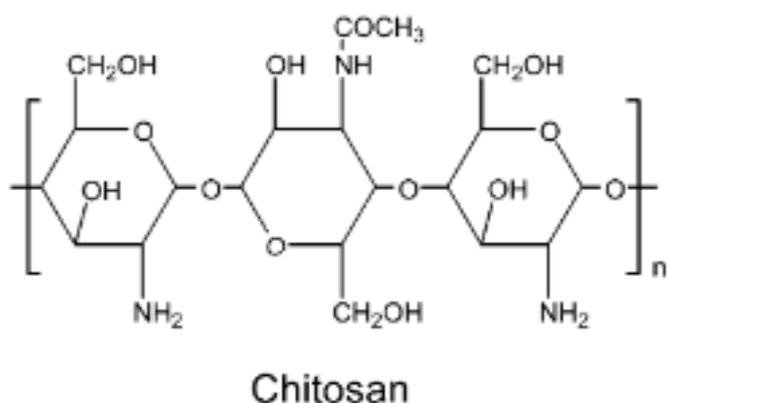
Su principal efecto adverso es la formación de tofos cutáneos debido a la persistencia del agente fotosensibilizante en la piel por periodos de hasta seis semanas. También podemos encontrar dolor, ardor, escozor o picazón, que se limitan a la zona iluminada durante la exposición a la luz, pero de escasa duración; eritema y edema leve de la zona tratada. Una sobredosis de luz puede provocar ampollas, ulceraciones o excesiva necrosis; fotosensibilidad cutánea durante 4 a 6 semanas, incluso hasta 6 meses; hiperpigmentación e hipopigmentación residual, la cual se resuelve pronto; reacciones alérgicas como urticaria a los fotosensibilizantes; puede causar náuseas, vómitos y alteraciones de la función hepática (Balata y cols., 2011).

I.5 Chitosán

A partir de los años 90 se introduce un nuevo método de eliminación de bacterias, que es el uso de nanopartículas de chitosán (Fernandes y cols., 2010) (ver Figura 2). El chitosán es un derivado polisacárido natural ampliamente usado en el campo médico y farmacéutico debido a sus excelentes propiedades biológicas: biocompatibilidad,

biodegradabilidad y no citotoxicidad (Fernandes y cols., 2010). Debido a estas propiedades y a su pH ácido, que le confiere una gran capacidad de quelación con diferentes iones metálicos, se utiliza ampliamente sobre todo en la industria textil, farmacéutica (componente de gasas y suturas médicas), alimentaria, cosmética y también en Medicina. Sin embargo, su alto peso molecular, que obstaculiza su solubilidad en medios acuosos libres de ácidos ha limitado en parte su uso práctico (Jeon y cols., 2014). También posee propiedades antitumorales e inmuno-estimulantes, antifúngicas y antimicrobianas (Fernandes y cols., 2010).

Figura 2. Estructura química del chitosán (Kean y cols, 2005)



I.5.1 Actividad antibacteriana

El tratamiento con chitosán, a pesar de sus diversas propiedades, se realiza principalmente por su capacidad antimicrobiana de amplio espectro, que le permite combatir bacterias que presentan resistencia antibiótica teniendo una actividad mayor frente bacterias Gram positivas que ante Gram negativas (Fernandes y cols., 2010).

Se han propuesto varias teorías para explicar su acción antimicrobiana. Aunque el modo de acción exacto todavía se desconoce, la hipótesis más aceptada es la de la pérdida de componentes intracelulares. Según este mecanismo, el chitosán cargado positivamente se une a la superficie cargada negativamente de la bacteria provocando

un cambio en la permeabilidad de la membrana que daría lugar a la salida de los componentes intracelulares y como consecuencia la muerte celular. Sin embargo, se ha observado que la actividad antimicrobiana del chitosán está limitada a condiciones ácidas debido a la pérdida de cargas positivas en el grupo amino cuando el pH es neutro lo que restringe su empleo como un agente antimicrobiano en un medio neutro (Peña y cols., 2013).

Estos efectos también han sido demostrados en tres especies de *Candida* observándose un gran flujo de iones K^+ y otras pequeñas moléculas, un aumento notable de la respuesta del ión Ca^{2+} , y la inhibición de la respiración, la fermentación y la viabilidad, así como disminución en el crecimiento (Cheng y cols., 2014).

I.5.2 Campos de actuación de chitosán

➤ Campos de actuación en medicina

El polímero natural chitosán y sus análogos han sido estudiados ampliamente como vectores de medicamentos. El 5-Fluoruracilo y paclitaxel son medicamentos de primera línea contra el cáncer que inhiben la proliferación de células tumorales interfiriendo en la síntesis de los ácidos nucleicos. Sin embargo, su eficacia está afectada por su baja biodisponibilidad y unión a los lípidos y su uso clínico es limitado debido a efectos indeseables tales como ataxia, alopecia y mielosupresión y porque su dosis está cercana a la toxicidad. Si estos medicamentos fueran transportados por las moléculas de chitosán o derivados, mejorarían sus propiedades de biodegradabilidad, se reducirían sus efectos secundarios y aumentaría su eficacia (Tan y cols., 2010).

También puede encontrarse en forma de hidrogel, (N-succinil-chitosan) que se utiliza para la autorregulación de la liberación de insulina cuando las concentraciones de glucosa en sangre aumentan mediante el bloqueo las enzimas glucosa-oxidasas y catalasas y modificar así la concentración de glucosa en sangre (Tan y cols., 2010).

➤ **Campos de actuación en odontología**

Mejora las propiedades antibacterianas de los cementos selladores si se combina con ellos como por ejemplo el óxido de cinc-eugenol. Es un método alternativo en la desinfección de los conductos radiculares (Da Silva y cols., 2013) y su presencia en la interfase dentinaria puede permitir la mineralización de la matriz de colágeno creando una barrera contra una nueva colonización bacteriana que podría inhibir la adhesión bacteriana a la superficie dental (Silva y cols., 2012).

Recientemente se ha observado que muestran un efecto prometedor en la remineralización de la dentina desmineralizada, más complicada de conseguir que la remineralización del esmalte debido a la abundante presencia de matriz orgánica de la dentina, preservando así el tejido dentinario en la medida de lo posible (Zhang y cols., 2014).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II.1. Justificación

En el tratamiento endodóntico convencional, la reducción de la carga bacteriana se consigue mediante la combinación de la instrumentación mecánica, el uso de diversos procedimientos de irrigación y el uso de fármacos antimicrobianos o preparados farmacológicos colocados en el canal radicular. Las bacterias involucradas en la infección del canal radicular son capaces de formar un biofilm, agrupadas en una comunidad metabólica de microorganismos embebidos en una matriz de polisacáridos que se adhieren a las paredes de los túbulos dentinarios, garantizándose así una larga supervivencia. Por otro lado, la presencia de detritus, no sólo reduce la eficacia de las sustancias utilizadas como irrigantes y la de los fármacos usados en los conductos para conseguir la desinfección, sino que, favorece la resistencia de las bacterias en los canales radiculares. Esta situación puede impedir el principal objetivo del tratamiento endodóntico: la eliminación de estos agentes etiológicos y la desinfección de los canales radiculares, favoreciendo el fracaso endodóntico.

Diferentes sustancias irrigantes han sido propuestas para reducir la infección endodóntica y desinfectar los canales radiculares. Entre estas soluciones, el NaOCl es el agente irrigante más ampliamente utilizado debido a su amplio espectro antibacteriano y a su capacidad para disolver remanentes orgánicos de tejido necrótico. Este puede ser utilizado a varias concentraciones que oscilan entre 0,5 y 5%. A bajas concentraciones (0,5-1%), principalmente disuelve tejido necrótico; mientras que a altas concentraciones (>1-5%) aumenta su capacidad disolvente y se amplían sus propiedades antibacterianas; sin embargo, su efecto como tóxico tisular también aumenta. Además, el NaOCl sólo penetrará en los tubulos dentinarios hasta una profundidad de 130 μm , mientras que la infección bacteriana puede penetrar hasta 1.000 μm alcanzando la unión cemento-dentina (Peters y cols., 2001).

En este escenario, la capacidad de penetración de algunas terapias láser podría reducir el número de fracasos de tratamientos endodónticos. Por este motivo, nuevas estrategias terapéuticas tales como la TFD están siendo investigadas en el tratamiento endodóntico debido a su acción bactericida tanto en dientes permanentes como temporales (Pinheiro y cols., 2009). La inactivación de microorganismos mediante TFD

se basa en la administración de un FS seguida de su activación mediante una irradiación a baja dosis con una luz visible a una determinada longitud de onda.

El uso de un FS capaz de absorber luz e iniciar la formación de radicales libres, ha ampliado en la actualidad la disponibilidad de un amplio rango de FSs que pueden ser utilizados en TFD. Por esta razón, en la actualidad existe una amplia investigación científica sobre la efectividad y los mecanismos de acción de numerosos FSs, particularmente colorantes fenotiazínicos, porfirinas y ftialocianinas. En la actualidad, el azul de metileno es el FS más ampliamente utilizado para el manejo bacteriano en los tratamientos endodónticos donde se usa la TFD.

El quitosán ha sido extensamente investigado en el campo de la biomedicina, en muchos casos por su actividad antimicrobiana. En la actualidad, se han propuesto varias teorías para explicar su acción antibacteriana, siendo la más aceptada la que justifica su acción por la capacidad del quitosán de destruir los componentes intracelulares bacterianos. Esto implica un mecanismo por el cual el quitosán cargado positivamente se adhiere a la membrana bacteriana provocando un cambio en la permeabilidad de la misma, lo cual causa la salida de componentes intracelulares y por lo tanto la muerte celular.

Los efectos del quitosán en TFD han sido estudiados, usándolo directamente como FS (Oh y cols., 2013; Fujimura y cols., 2014) o como potenciador de otros FSs, *in vitro* e *in vivo* (Kim y cols., 2013) para el tratamiento del cáncer e *in vitro* para el tratamiento de bacterias usándolo como potenciador de otros FSs como la rosa de Bengala (Shrestha y Kishen, 2012) y la eritrosina (Chen y cols., 2012). Sin embargo, el posible efecto del quitosán como potenciador del azul de metileno como FS para el tratamiento *in vitro* del *E. faecalis* con TFD, no ha sido previamente estudiado.

II.2. Objetivos

El **objetivo general** fue evaluar la eficacia antibacteriana de la TFD y el chitosán contra el *E.faecalis* y estudiar el posible efecto potenciador del chitosán sobre el FS azul de metileno en dientes humanos extraídos experimentalmente infectados, tratados con TFD.

El objetivo general puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos que nos permitan sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio:

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto del NaOCL, la TFD y el chitosán por separado y la combinación de TFD + chitosán sobre las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *E.faecalis* en los canales radiculares de dientes humanos previamente infectados.
2. Valorar la acción del NaOCL, la TDF y el chitosán por separado y la combinación de TFD + chitosán sobre la contminación bacteriana y el barrillo dentinario en los canales radiculares de dientes humanos previamente infectados.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Material

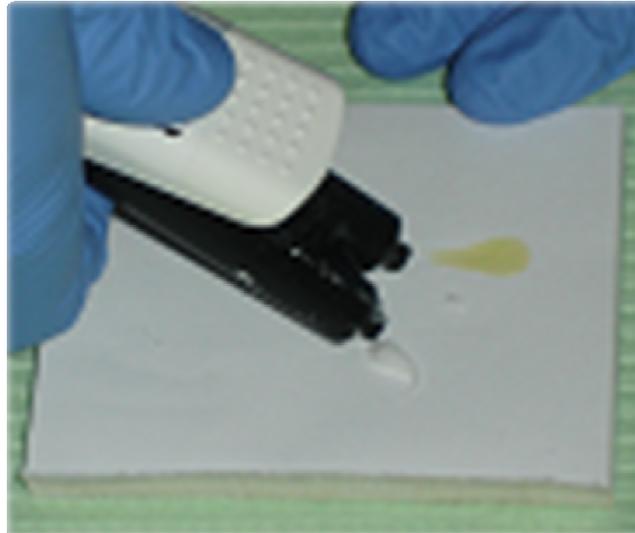
Para este estudio se han empleado un total de 102 dientes unirradiculares adultos extraídos por motivos periodontales conservados en suero salino tras la exodoncia. Para la preparación biomecánica de los conductos se ha utilizado el sistema de instrumentación recíprocante WaveOne® (Maillefer S.A., Ballaigues, Suiza): limas #20, #25 y #40 (ver figura 3).

Figura 3: Material empleado para el tratamiento endodóntico. A) Dientes unirradiculares, b) sistema WaveOne c) Limas de calibre # 20 y #40



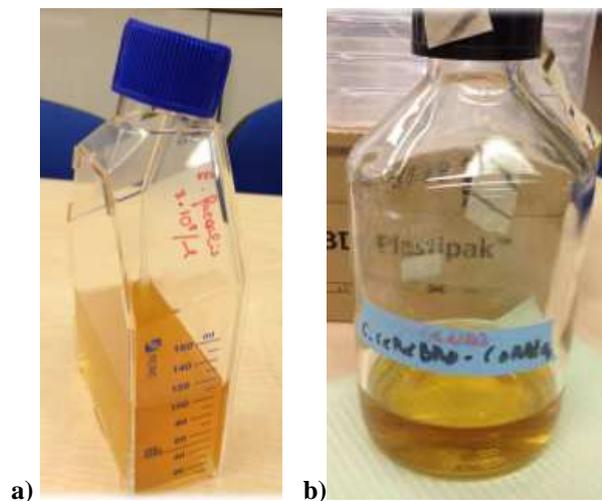
Para el sellado apical de los dientes se utilizó un ionómero de vidrio modificado con resina (Vitrebond[®], 3MEspe, Madrid, España). (ver figura 4).

Figura 4: Vitrebond[®] (3MEspe, Madrid, España). Procedimiento de preparación del ionómero.



La cepa usada de *Enterococcus faecalis* fue la cepa ATCC 2912 (American Cell Culture Collection) y el medio de cultivo fue el Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Merck, Madrid, España). (ver figura 5)

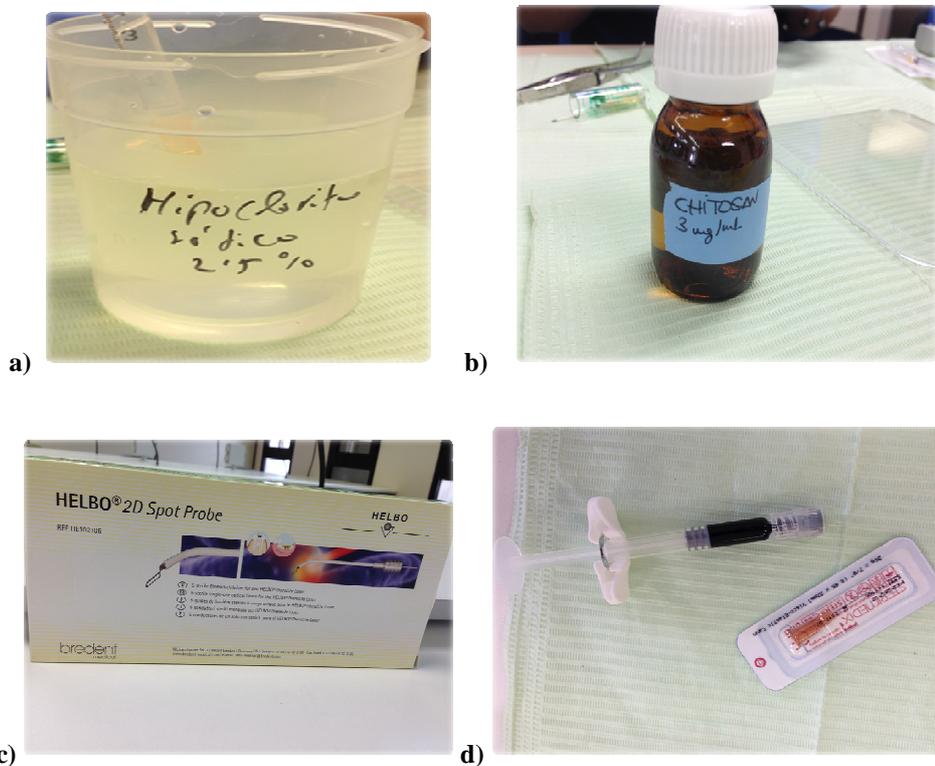
Figura 5: Materiales empleados para la inoculación. A) *E. faecalis* cepa ATCC 2912 b) medio de cultivo BHI



Los antimicrobianos empleados fueron (ver figura 6):

1. El hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.5% (Tecnoquim S.L., Murcia, España).
2. Chitosán 3mg/ml (Sigma Aldrich Chemistry S.A, Madrid, España).
3. Kit de TFD (HELBO[®]; photodynamic Systems GmbH, Wells, Austria) con un láser diodo de mano (HELBO[®] TheraLite Laser, HELBO[®] 3D Pocket Probe, Photodynamic Systems GmbH, Wells, Austria) con una longitud de onda de 660 nm y un potencial de 100 mW. El colorante fotosensible fue el azul de toluidina (HELBO[®] Blue Photosensitizer; Photodynamic Systems GMBH, Wells, Austria).

Figura 6: Sustancias antimicrobianas aplicadas en las diferentes terapias. A) NaOCl al 2.5% (Tecnoquim S.L., Murcia, España), b) Chitosán 3mg/ml (Sigma Aldrich Chemistry S.A, Madrid, España) c) kit de TFD (HELBO[®]; photodynamic Systems GmbH, Wells, Austria) y d) azul de toluidina (HELBO[®] Blue Photosensitizer; Photodynamic Systems GMBH, Wells, Austria)



III.2. Métodos

III.2.1 Tratamiento endodóntico

El estudio fue aprobado por el comité de bioética de la universidad de Murcia, España (Anexo 1). El modelo usado en el presente estudio fue una modificación del descrito por Haapasalo y Orstavik (Haapasalo y Orstavik, 1987).

Un total de 102 dientes adultos, extraídos, unirradiculares e intactos, fueron recogidos y metidos en solución salina estéril durante 2-4 semanas.

Las tinciones y el sarro fueron eliminados con ultrasonidos (Cavitron, Dentsply Ltd, Balligres, Suiza). La superficie externa de cada diente fue limpiada con povidona yodada al 10%. Después de 5 minutos, el desinfectante se eliminó con alcohol isopropil y los dientes pasaron a ser decoronados.

Una vez realizada la amputación coronal con el objetivo de facilitar el acceso radicular y preparación biomecánica de los conductos se procedió a la limpieza y conformación del conducto (ver figura 7).

Figura 7: Diente con corona amputada



Se permeabilizaron los conductos con una lima K #10 y se calculó la longitud de trabajo (LT) (a 1mm del ápice radicular) con una lima K #15. Se instrumentaron los conductos desde la lima #15 hasta llegar a la lima K #25 o K#30 dependiendo de la amplitud del conducto.

Los 2/3 corales se prepararon con las fresas Gates números 4, 3 y 2 irrigándose con suero salino entre cada fresa. El 1/3 apical se preparó con las limas rotatorias WaveOne[®] (Maillefer S.A., Ballaigues, Suiza) hasta alcanzar la LT (ver figura 8).

Figura 8: Tratamiento endodóntico. Instrumentación de conductos mediante el sistema WaveOne[®] (Maillefer S.A., Ballaigues, Suiza) con una lima de calibre # 20.



Al finalizar se irrigaron los conductos con EDTA al 17% (DentaFlux[®], Madrid, España) durante 1 minuto para eliminar el barrillo dentinario y a continuación con Hipoclorito Sódico al 2.5%,(Tecnoquim S.L., Murcia, España). Finalmente se secaron los conductos con puntas de papel del número 25 (Maillefer S.A., Ballaigues, Suiza).

Acto seguido se sellaron los ápices de los dientes con ionómero de vidrio modificado con resina (Vitrebond[®],3MEspe, Madrid, España) (ver figura 9).

Figura 9. Sellado apical con ionómero de vidrio (Vitrebond[®], 3MEspe, Madrid, España).

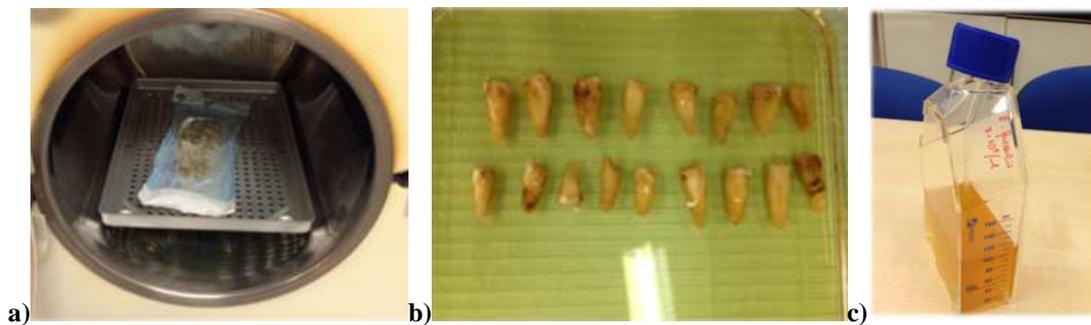


A continuación los dientes se mantuvieron en suero fisiológico hasta que se procedió a introducirlos en Etanol Dimetilado al 70% (Tecnoquim S.L., Murcia, España), durante 24 horas hasta el momento de la inoculación.

III.2.2. Inoculación.

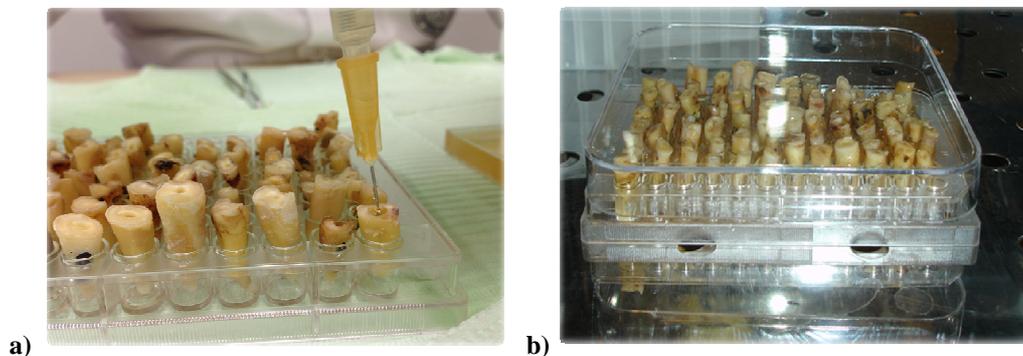
Los dientes se esterilizaron en un autoclave a 135° durante 15 minutos. Se introdujo una bandeja de metal con agua destilada en la estufa para humedecer previamente el medio. 24 horas después se introdujeron los dientes en un recipiente cerrado que contenía el medio de cultivo Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Merck, Madrid, España) hasta que los cubrió totalmente y estos recipientes se colocaron en la estufa (JP Selecta S.A., Barcelona, España). Previamente el *Enterococcus faecalis* cepa ATCC 2912 (American Cell Culture Collection) se cultivó de forma pura en 1 mL de BHI (Merck, Madrid, España) hasta conseguir una turbidez óptica de 1 McFarland estándar inoculando una concentración de 3×10^8 cel/ml que fueron cuantificadas mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 600 nm y una absorbancia de 0.137nm y se incubó a 37° C durante 1 hora (ver figura 10).

Figura 10: Preparación previa a la inoculación. A) Esterilización en un autoclave, b) dientes en el interior de BHI, c) *E. faecalis* cepa ATCC 2912



Una hora después se procedió a la inoculación de 0.1ml de *Enterococcus faecalis* cepa ATCC 2912 (American Cell Culture Collection) en cada uno de los 85 dientes y se incubaron a 37°C durante 48 horas en posición vertical en el interior de unos pocillos de plástico (ver figura 11).

Figura 11: Procedimiento de inoculación. A) Inoculación de *E. faecalis* en los 85 dientes, b) introducción de los dientes en la estufa

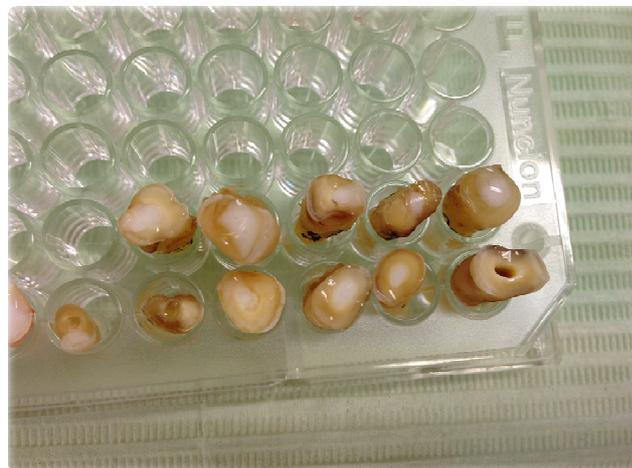


Tras la incubación de esta bacteria durante 48 horas, los 102 dientes se dividieron en 6 grupos de tratamiento y se aplicaron las diferentes terapias.

III.2.3. Tratamiento antibacteriano

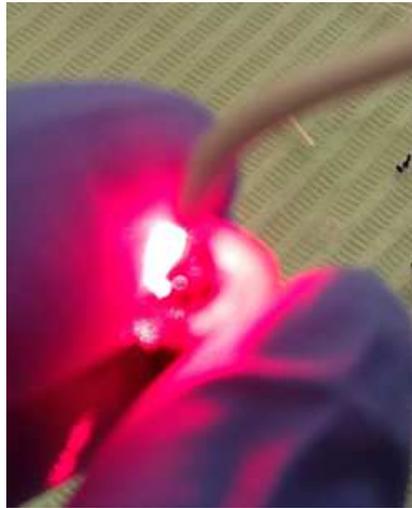
- **Grupo 1** (n=17): Control positivo. Grupo sin tratamiento
- **Grupo 2** (n=17): Control negativo. Grupo sin inoculación ni tratamiento.
- **Grupo 3** (n=17): Hipoclorito Sódico 2,5% (Tecnoquim S.L., Murcia, España). . Se irrigó con Hipoclorito Sódico y se mantuvo durante 5 minutos, eliminándose posteriormente con puntas de papel y suero salino (85% v/v) (ver figura 12).

Figura 12: Tratamiento antibacteriano del grupo 2 sometido a terapia con NaOCl al 2.5%.



- **Grupo 4** (n=17): TFD (HELBO[®]; photodynamic Systems GmbH, Wells, Austria) con un láser diodo de mano (HELBO[®] TheraLite Laser, HELBO[®] 3D Pocket Probe, Photodynamic Systems GmbH, Wells, Austria) . El colorante fotosensible azul de toluidina (HELBO[®] Blue Photosensitizer; Photodynamic Systems GMBH, Wells, Austria). se aplicó en el conducto durante 3 minutos. A continuación se aplicó la láser diodo de mano durante 60 segundos (ver figura 13).

Figura 13: Tratamiento antibacteriano. Aplicación de la TFD en las muestras del grupo 3



- **Grupo 5** (n=17): Chitosan 3 mg/ml (Sigma Aldrich Chemistry S.A, Madrid, España). El Chitosan se diluyó en agua destilada de hasta obtener las concentraciones de trabajo 3 mg/ml (ver figura 14).

Figura 14: Tratamiento antibacteriano. Aplicación de chitosán en las muestras del grupo 4

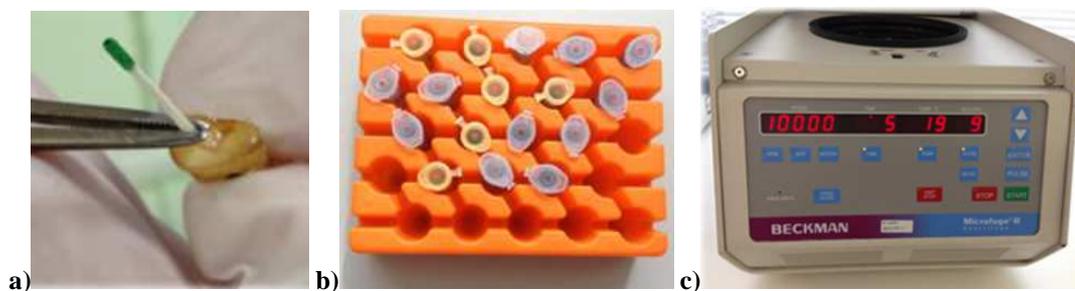


- **Grupo 6** (n=17): TFD (HELBO®; photodynamic Systems GmbH, Wells, Austria) con un láser diodo de mano (HELBO® TheraLite Laser, HELBO® 3D Pocket Probe, Photodynamic Systems GmbH, Wells, Austria) + Chitosan 3 mg/ml (Sigma Aldrich Chemistry S.A, Madrid, España).

III.2.4. Cuantificación bacteriana

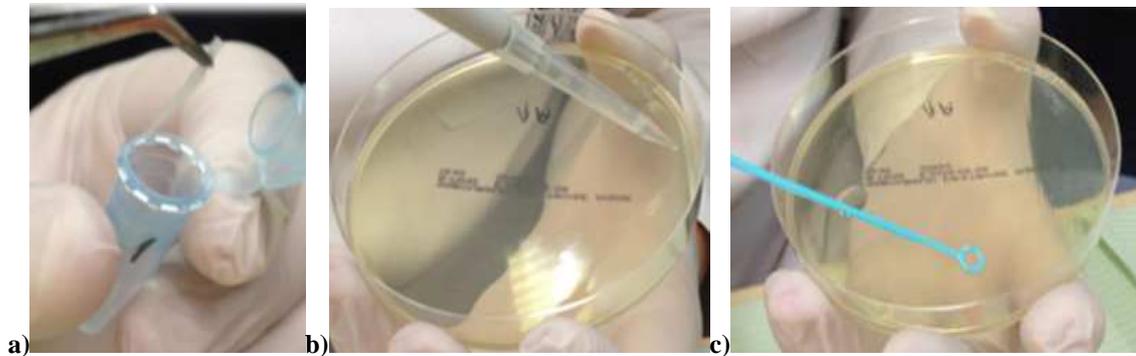
Una vez efectuado el tratamiento tras la irrigación previa de los conductos con suero salino (0.85%) se recogieron 3 muestras del interior de todos los conductos con puntas de papel (Maillefer®, Ballaigues, Suiza) . Tras esto se introdujeron en un microtubo Eppendorf con 0.1 mL de suero salino y se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 r.p.m. en una centrifugadora para Eppendorf (Beckmann Coulter S.A., Madrid, España) (ver figura 15).

Figura 15: Preparación para la cuantificación bacteriana. A) recogida de muestras con puntas de papel, b) depósito de las puntas de papel en Eppendorf (Beckmann Coulter S.A., Madrid, España) , c) centrifugación de los Eppendorf durante 5 minutos a 10000 rpm.



Se retiraron cuidadosamente las puntas de papel (Maillefer®, Ballaigues, Suiza). Finalmente se eliminó el sobrenadante quedándonos con un depósito celular de 100µl que fueron extendidos por duplicado en placas de Agar Sangre (Scharlau S.L., Barcelona, España) y se incubaron durante 48h en la estufa (JP Selecta S.A., Barcelona, España) (ver figura 16).

Figura 16: Preparación para la cuantificación bacteriana. A) Retirada de las puntas de papel de los eppendorf, b) obtención de depósito celular una vez eliminado el sobrenadante, c) aplicación en placas de agar.

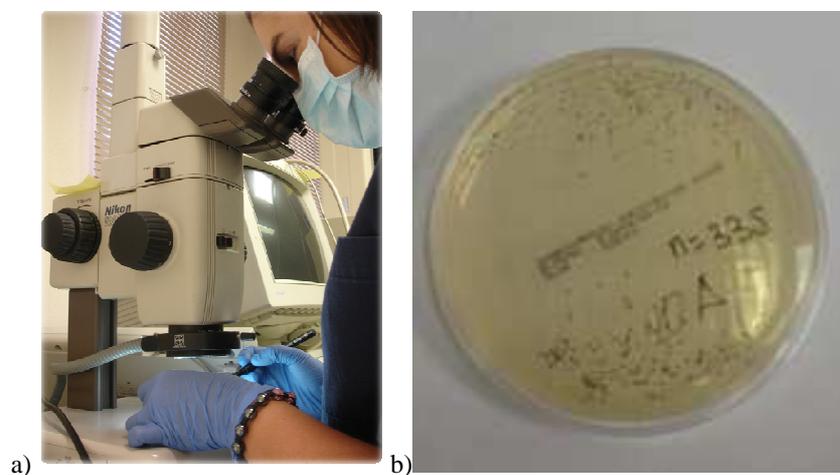


Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) mediante un microscopio óptico (Nikon[®] SMZ-U, Izasa, Barcelona, España) (ver figura 17) y la fórmula empleada para calcular el número de UFC/ml fue:

Nº de colonias significantes x Factor decimal de dilución (FDD)

Volumen inicial sembrado

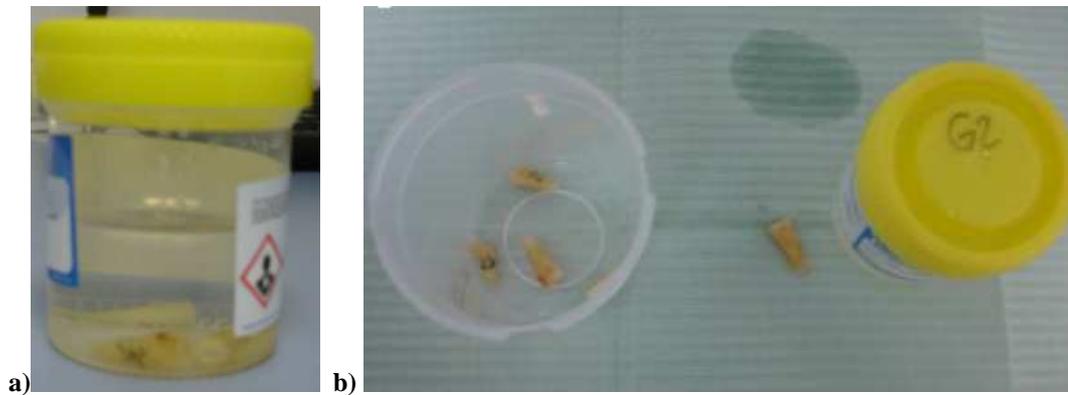
Figura 17: Recuento de UFC/ml. A) Empleo de un microscopio óptico, b) resultado de recuento en una de las muestras.



III.2.5. Estudio con microscopio electrónico de barrido (meb)

Para la preparación de los dientes para su estudio a través de MEB (JSM-600 JEOL[®], Tokio, Japón) se seleccionaron cinco dientes de cada grupo y se procedió a un proceso de deshidratación de los mismos durante una semana en formolaldehído al 4% (Tecnoquim S.L., Murcia, España) (ver figura 18).

Figura 18: Procedimiento de preparación para su estudio con MEB. A) Dientes introducidos en formaldehído al 4%, b) dientes una semana después.

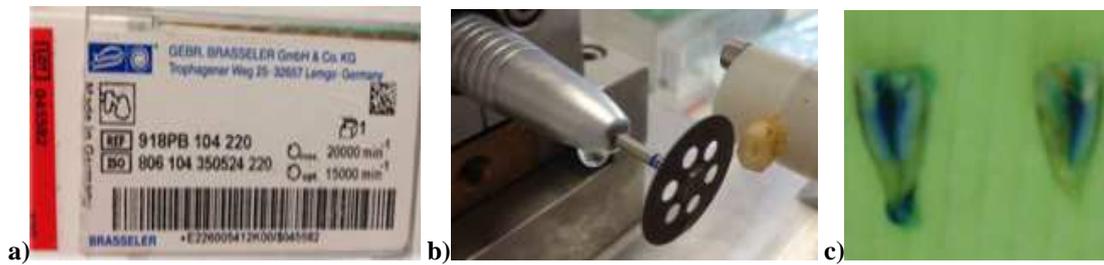


Posteriormente procedimos a deshidratarlos con diferentes concentraciones de etanol repitiendo el ciclo dos veces.

- 30 minutos en etanol al 70%
- 30 minutos en etanol al 95%
- 30 minutos en etanol al 100%

A continuación los dientes se seccionaron longitudinalmente en sentido vestíbulo-lingual con un disco metálico (GEBR. BRASSELER GMBH & Co. KG, Lemgo, Alemania) (ver figura 19).

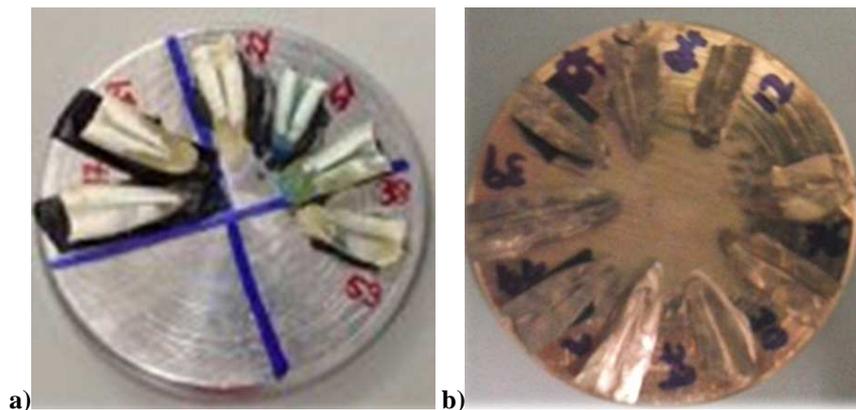
Figura 19: Sección de los dientes para su posterior estudio en MEB. A) Disco metálico de corte empleado, b) sección longitudinal de los dientes, c) resultado de la sección.



Una vez seccionados se fijaron en Glutaraldehído al 3% (EMS, Hatfield, PA, USA) durante 5h y se cambió a un tampón lavador llamado Escacodilato sódico + sacarosa 2.4%, 0.1 molar.

Tras llevar a cabo la fijación se escogieron cinco dientes de cada grupo de estudio colocando una de las dos secciones longitudinales de cada diente en una platina metálica mediante carbono adhesivo para realizar posteriormente un baño de oro (ver figura 20).

Figura 20: Preparación para análisis MEB. A) Fijación de cortes transversales en la platina, b) secciones longitudinales bañadas en oro.



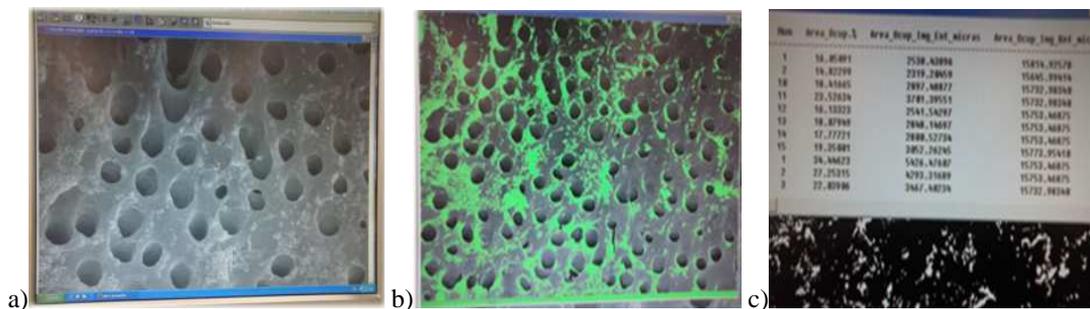
Posteriormente se llevaron a cabo las observaciones a nivel coronal, medio y apical de cada una de las secciones dentales con dos magnificaciones diferentes (1600x y 5000x), de forma que se obtuvieron seis medidas de cada aumento por cada diente.

Inicialmente las muestras fueron analizadas mediante la obtención de imágenes para observar la contaminación bacteriana y barrillo dentinario existentes en cada tercio del canal radicular. (Sousa y cols., 2010).

III.2.6. Análisis de imagen. MIP4

Por último las imágenes obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido fueron analizadas mediante un programa informático denominado MIP4 en las instalaciones del SACE mediante el cual pudimos obtener el porcentaje por área existente de bacterias y detritos en el canal radicular (ver figura 21).

Figura 21: Análisis para identificar presencia o ausencia de contaminación y barrillo dentinario en la superficie del canal radicular usando el software de histomorfometría MIP 4. A: Captura de imagen. B: Escala de grises y segmentación. C: Cálculo del porcentaje de área contaminada y con barrillo dentinario en relación al total del área examinada.



III.2.7. Tratamiento estadístico

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico SP SS 20.0 (SPSS® inc, Chicado IL, USA) para windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos.

Estadística descriptiva:

En primer lugar, para el análisis descriptivo de la distribución general de la muestra, así como para el análisis de cada una de las variables (tanto en conjunto como

para cada uno de los subgrupos); se han hallado valores tales como: media, desviación típica, mediana y los valores máximos y mínimos (rango).

Estadística inferencial:

En segundo lugar, para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería rechazar (cuando esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia), cuando la probabilidad mínima de rechazo (el llamado “*p-valor*”) no sea superior al nivel crítico estándar de 0.05.

Se realizó el test de normalidad de Kolmogorov- Smirnov ($p=0.65$) y el test de homogeneidad de la varianza de Levene ($p=30$) para comprobar que la muestra seguía una distribución normal y para poder aplicar pruebas paramétricas respectivamente.

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA de un factor) para comparar tres o más medias (de muestras independientes). Posteriormente, utilizamos pruebas post-hoc mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey, asumiendo varianzas iguales.

IV.RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1 Recuento de UFC/ml

El recuento de *E.fecaelis* en los conductos radiculares (expresado como \log_{10} UFC/ml) fue cero en el grupo de control negativo. El grupo de control positivo mostró un elevado número de UFC/ml ($6.01 \pm 0.84 \log_{10}$ UFC/ml), con diferencias estadísticamente significativas en comparación con los otros grupos de tratamiento ($p \leq 0.05$).

El grupo de tratamiento que mostró el recuento más bajo de UFC/ml fue el de TFD+ Chitosán 3 mg/ml ($3.71 \pm 1.47 \log_{10}$ UFC/ml), seguido por el grupo de TFD ($3.81 \pm 1.46 \log_{10}$ UFC/ml), cuyo resultado fue muy similar al obtenido en el grupo de NaOCl al 2.5% ($3.87 \pm 1.88 \log_{10}$ UFC/ml) (ver gráfica 1, tabla 1).

Gráfica 1: Efecto de los agentes antibacterianos contra el *Enterococcus Faecalis*

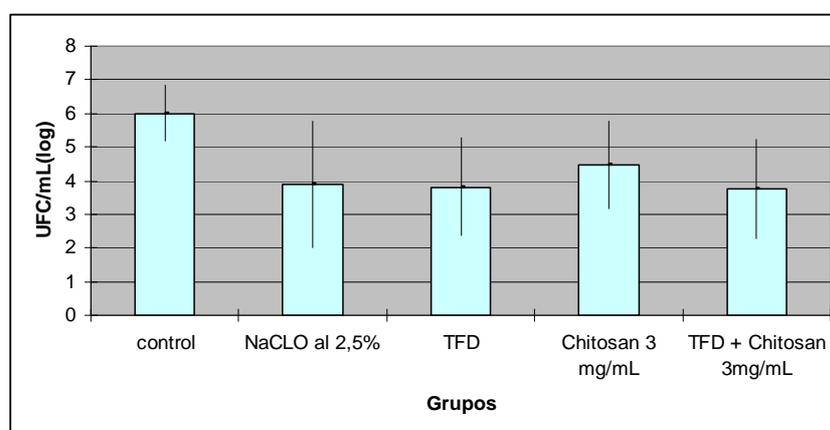


Tabla 1: Efecto de los agentes antibacterianos contra el *Enterococcus Faecalis* (ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Grupos de estudio	n	UFC/mL (\log_{10}) media \pm DT*
Control positivo	17	6,01 \pm 0,84^a
NaCLO al 2,5%	17	3,87 \pm 1,88^b
TFD	17	3,81 \pm 1,46^b
Chitosán 3 mg/mL	17	4,47 \pm 1,31^b
TFD + Chitosán 3 mg/mL	17	3,77 \pm 1,47^b
* DT = desviación típica. Los grupos marcados con diferentes letras superescritas mostraron diferencias significativas		

Se han observado diferencias significativas con un valor $p < 0.001$ entre el grupo control y los grupos de NaOCl al 2.5%, TFD y TFD + chitosán. Para el grupo de chitosán el valor de p es igual a 0.02 frente al grupo control (ver tabla 2)

Tabla 2: Resultados del grupo control respecto al resto de grupos. (ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Control	Grupos de estudio Media \pm DT*	p-valor
6,01 \pm 0,84	NaCLO al 2,5% 3,87 \pm 1,88	<0,001
	TFD 3,81 \pm 1,46	<0,001
	Chitosán 3 mg/mL 4,47 \pm 1,31	0.02
	TFD + Chitosán 3mg/mL 3,77 \pm 1,47	<0,001

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio (ver tabla 3,4,5,6).

Tabla 3: Resultados del NaOCl al 2.5% respecto al resto de grupos. (ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey;p< 0.05).

NaCLO al 2,5%	Grupos de estudio	
	Media ± DT*	p-valor
3,87 ± 1,88	Control 6,01 ± 0,84	<0,001
	TFD 3,81 ± 1,46	1.00
	Chitosán 3 mg/mL 4,47 ± 1,31	0.74
	TFD + Chitosán 3mg/mL 3,77 ± 1,47	1.00

Tabla 4: Resultados de la TFD respecto al resto de grupos (ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey;p< 0.05).

TFD	Grupos de estudio	
	Media ± DT*	p-valor
3,81 ± 1,46	Control 6,01 ± 0,84	<0,001
	NaCLO al 2,5% 3,87 ± 1,88	1.00
	Chitosán 3 mg/mL 4,47 ± 1,31	0.66
	TFD + Chitosán 3mg/mL 3,77 ± 1,47	1.00

Tabla 5: Resultados del chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey;p< 0.05).

Chitosán 3 mg/mL	Grupos de estudio Media ± DT*	p-valor
4,47 ± 1,31	Control 6,01 ± 0,84	0.02
	NaCLO al 2,5% 3,87 ± 1,88	0,74
	TFD 3,81 ± 1,46	0,66
	TFD + Chitosán 3mg/mL 3,77 ± 1,47	1.00

Tabla 6: Resultados de TFD+ Chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey;p< 0.05).

TFD+Chitosán 3mg/ml	Grupos de estudio Media ±DT*	p-valor
3,77 ± 1,47	Control 6,01 ± 0,84	<0,001
	NaCLO al 2,5% 3,87 ± 1,88	1.00
	TFD 3,81 ± 1,46	1.00
	Chitosán 3 mg/mL 4,47 ± 1,31	0.62

IV.2 Grado de contaminación

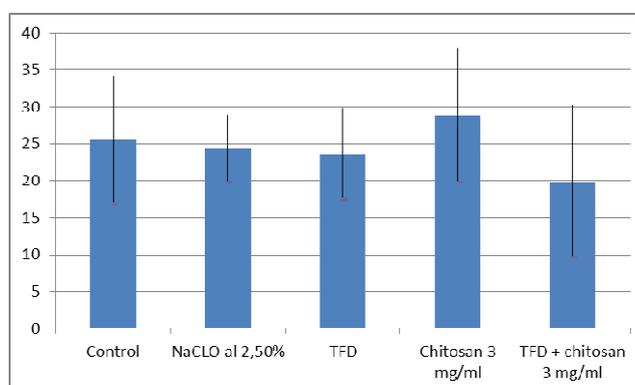
Se tomaron dos imágenes por tercio de cada diente, una a 1600x y otra a 5000x obteniendo un total de 714 imágenes con MEB. Los resultados obtenidos del estudio de las imágenes adquiridas al microscopio electrónico de barrido de cada uno de los tercios de los dientes de cada grupo de estudio mostraron unos valores de $25,45 \pm 8,65$; $25,61 \pm 5,56$; $24,37 \pm 6,57$ y $25,14 \pm 6,09$ para el tercio coronal, medial, apical y superficie total respectivamente, siendo muy similares en los grupos 2, 3 y 4, aunque un poco inferiores en el grupo TFD + Chitosán 3mg/ml con $19,89 \pm 10,33$; $20,16 \pm 9,69$; $18,13 \pm 6,46$ y $19,39 \pm 7,99$ para cada tercio y superficie total en último lugar (ver tabla 7, gráfica 2, 3, 4 y 5).

Tabla 7: Comparación del porcentaje de área ocupada por contaminantes y desechos entre los grupos de estudio (ANOVA y test de comparaciones múltiples HSD de Tukey).

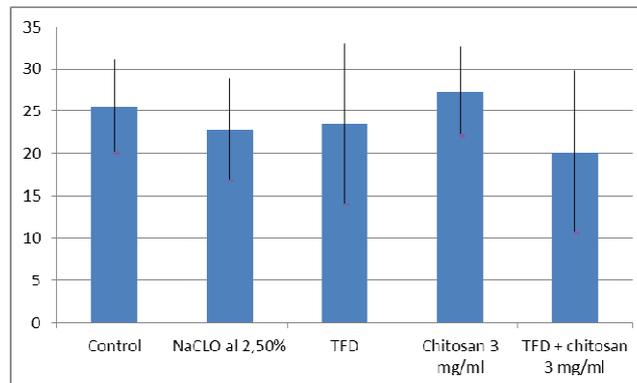
Grupos de estudio	n	Coronal(%) media \pm DT*	Medio(%) media \pm DT*	Apical(%) media \pm DT*	Total(%) media \pm DT*
Control positivo	7	$25,45 \pm 8,65^a$	$25,61 \pm 5,56^b$	$24,37 \pm 6,57^c$	$25,14 \pm 6,09^d$
NaCLO al 2,5%	6	$24,28 \pm 4,58^a$	$22,88 \pm 6,11^b$	$19,39 \pm 4,24^c$	$22,19 \pm 4,41^d$
TFD	7	$23,67 \pm 6,23^a$	$23,47 \pm 9,51^b$	$22,08 \pm 7,71^c$	$23,07 \pm 7,49^d$
Chitosan 3mg/ml	5	$28,79 \pm 9,06^a$	$27,33 \pm 5,32^b$	$21,54 \pm 5,33^c$	$25,89 \pm 6,12^d$
TFD + Chitosan 3 mg/ml	7	$19,89 \pm 10,33^a$	$20,16 \pm 9,69^b$	$18,13 \pm 6,46^c$	$19,39 \pm 7,99^d$

* DT = desviación típica. Los grupos marcados con diferentes letras superescritas mostraron diferencias significativas

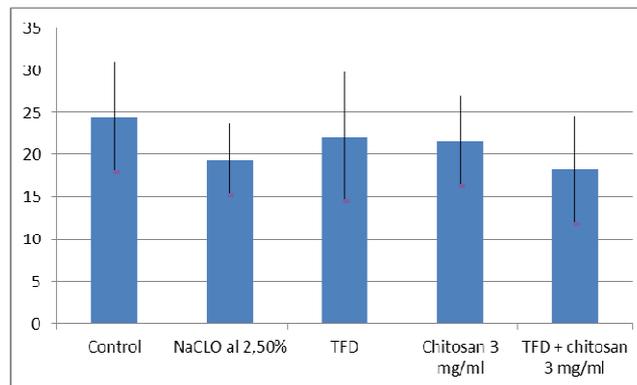
Gráfica 2: Porcentaje de área ocupada por contaminantes y desechos entre los grupos de estudio en el tercio corona.



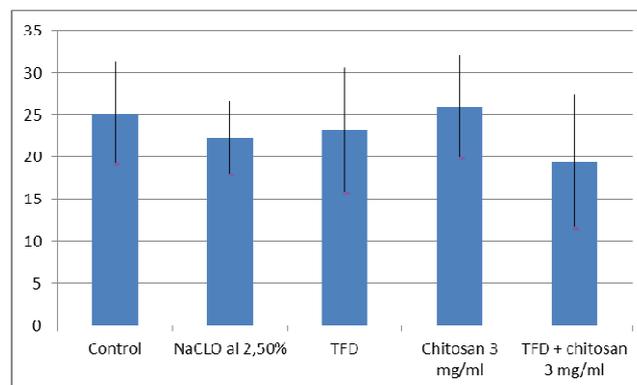
Grafica 3 Porcentaje de área ocupada por contaminantes y desechos entre los grupos de estudio en el tercio medio.



Grafica 4: Porcentaje de área ocupada por contaminantes y desechos entre los grupos de estudio en el tercio apical.



Gráfica 5: Porcentaje de área ocupada por contaminantes y desechos entre los grupos de estudio en la superficie total.

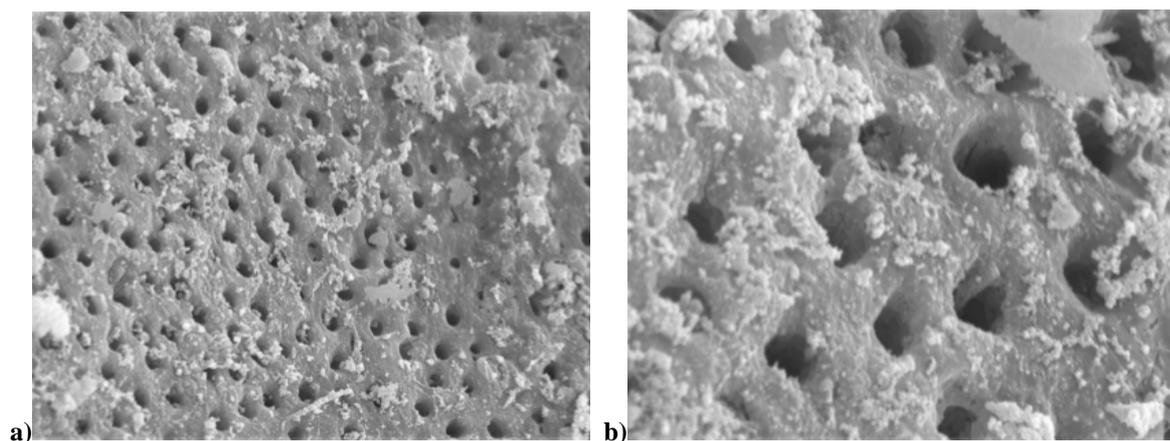


Los resultados obtenidos en el estudio del tercio coronal mostraron que no hay diferencias significativas del grupo control respecto al resto de grupos (ver tabla 8, Figura 22).

Tabla 8: Resultados del grupo control positivo respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias ± DT	p-valor
Grupo control positivo	2	1,166 ± 4,489	0,999
	3	1,776 ± 4,313	0,994
	4	-3,346 ± 4,724	0,953
	5	5,562 ± 4,313	0,7

Imagen 22: a) Tercio coronal del grupo control positivo a 1600x, b) Tercio coronal del grupo control positivo a 5000x.



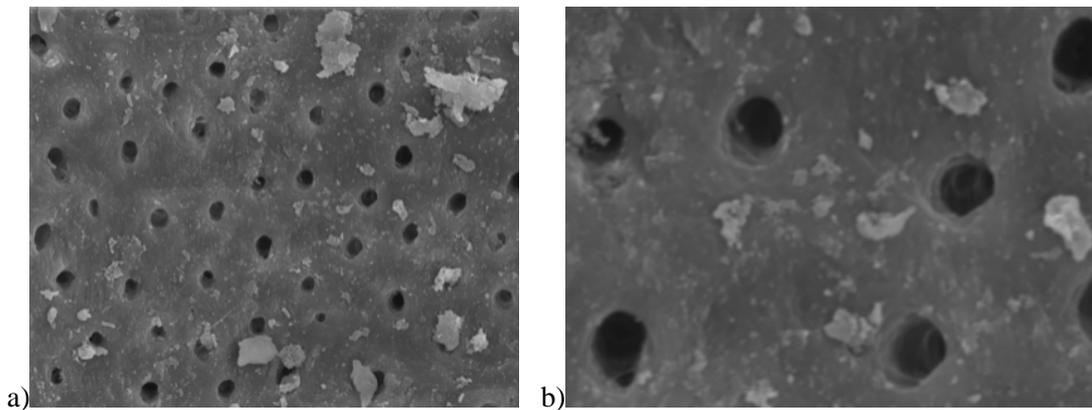
En la imagen a) podemos ver un alto de grado de contaminación y en la imagen b) se podemos observar con más claridad los túbulos dentinarios rodeados de barrillo dentinario y la presencia de microorganismos.

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio (ver Tablas 9, 10, 11, 12 y Figuras 23, 24, 25, 26).

Tabla 9: Resultados del NaOCl al 2.5% respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 2	1	-1,166 \pm 4,489	0,999
	3	0,610 \pm 4,489	1
	4	-4,512 \pm 4,886	0,885
	5	4,396 \pm 4,489	0,862

Figura 23: a) Tercio coronal del grupo 3 a 1600x, b) Tercio coronal del grupo 3 a 5000x.

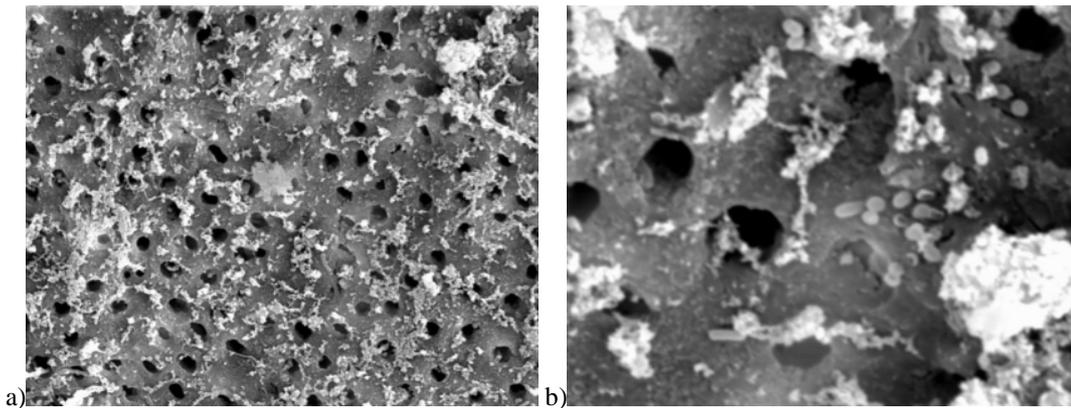


En la imagen a) se observa el área correspondiente al tercio coronal del grupo 3 con apenas contaminación con respecto al grupo control positivo y en la imagen b) podemos ver con más detalle los túbulos dentinarios de la misma zona con una mínima cantidad de barrillo dentinario y ausencia de microorganismos.

Tabla 10: Resultados de la TFD respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 3	1	-1,776 \pm 4,313	0,994
	2	-0,610 \pm 4,489	1
	4	-5,123 \pm 4,724	0,813
	5	3,785 \pm 4,313	0,903

Figura 24: a) Tercio coronal del grupo 4 a 1600x, b) Tercio coronal del grupo 3 a 5000x.

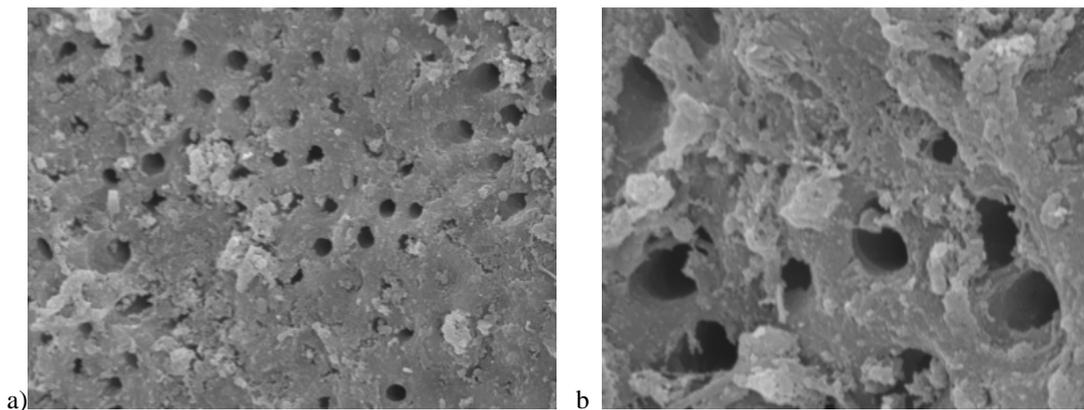


En la imagen a) podemos ver el área del tercio coronal del grupo 4 altamente contaminada por lo que parece ser barrillo dentinario y en la imagen b) se observa con más claridad los túbulos dentinarios rodeados de barrillo y microorganismos (Estreptococos).

Tabla 11: Resultados del chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 4	1	3,346 \pm 4,724	0,953
	2	4,512 \pm 4,886	0,885
	3	5,123 \pm 4,724	0,813
	5	8,901 \pm 4,724	0,349

Figura 25: a) Tercio coronal del grupo 5 a 1600x, b) Tercio coronal del grupo 5 a 5000x.

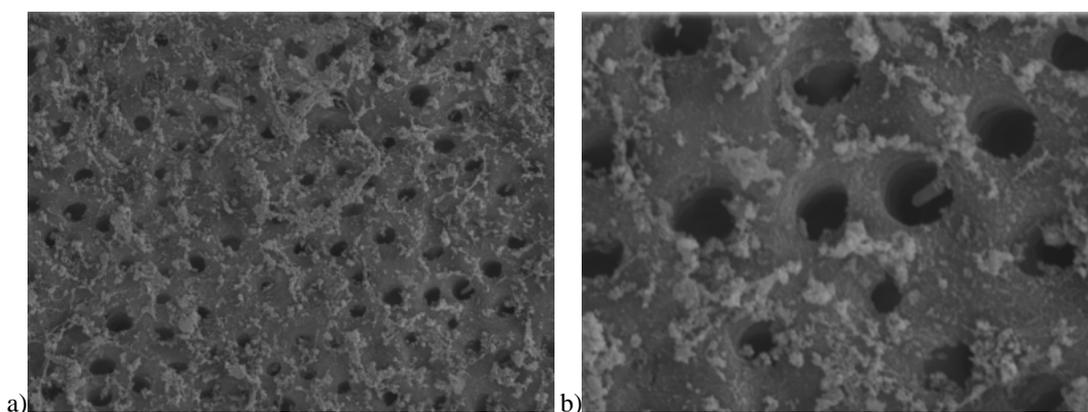


En la imagen a) se puede observar el área coronal con algunos restos contaminantes confirmándose en la imagen b) en la que se ve con más detalle que a pesar de haber restos de barrillo no se observan microorganismos.

Tabla 12: Resultados de TFD+ Chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 5	1	-5,562 \pm 4,313	0,7
	2	-4,396 \pm 4,489	0,862
	3	-3,785 \pm 4,313	0,903
	4	-8,901 \pm 4,724	0,349

Figura 26: Tercio coronal del grupo 5 a 1600x, b) Tercio coronal del grupo 5 a 5000x.



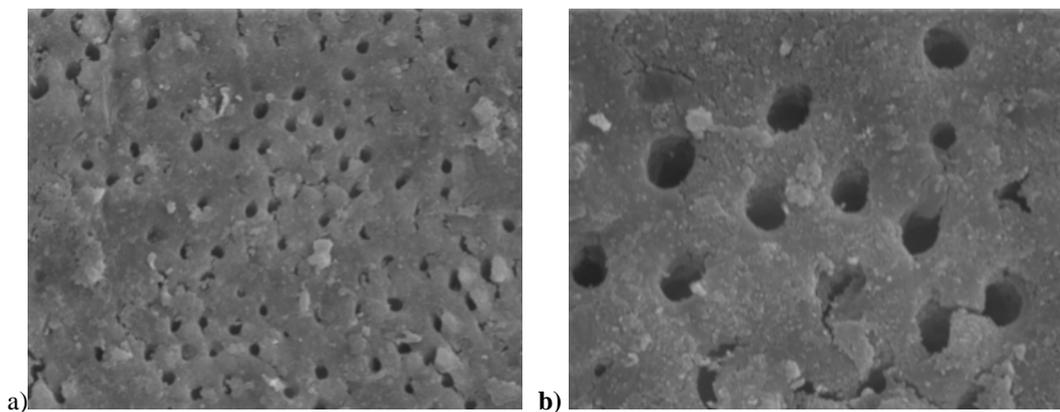
En la imagen a) se puede observar un área muy contaminada y en la imagen b) se confirma presencia de restos contaminantes alrededor de los túbulos y microorganismos.

Respecto al tercio medial los resultados obtenidos mostraron que no hay diferencias significativas del grupo control respecto al resto de grupos como en el tercio coronal (ver tabla 13, figura 27).

Tabla 13: Resultados del grupo control respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo control positivo	2	2,715 \pm 4,271	0,968
	3	2,125 \pm 4,104	0,985
	4	-1,730 \pm 4,496	0,995
	5	5,432 \pm 4,104	0,679

Figura 27: a) Tercio medio del grupo 1 a 1600x, b) Tercio medio del grupo 1 a 5000x.



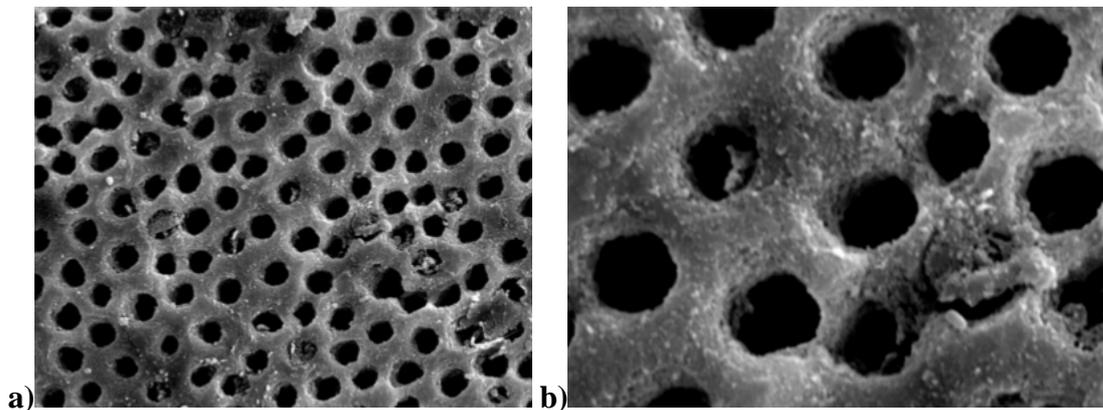
En la imagen a) se observa el tercio medio de la superficie dental estudiada del grupo 1 el cual está prácticamente sin contaminar, como también se puede ver en la imagen b) con más detalle.

Tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio al igual que en el tercio anterior (ver tabla 14, 15, 16, 17 y figura 28,29,30,31).

Tabla 14: Resultados del NaOCl al 2.5% respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
NaOCl al 2.5%	1	-2,715 \pm 4,271	0,968
	3	2,125 \pm 4,104	0,985
	4	-1,730 \pm 4,496	0,995
	5	5,432 \pm 4,104	0,679

Figura 28: a) Tercio medio del grupo 2 a 1600x, b) Tercio medio del grupo 2 a 5000x.

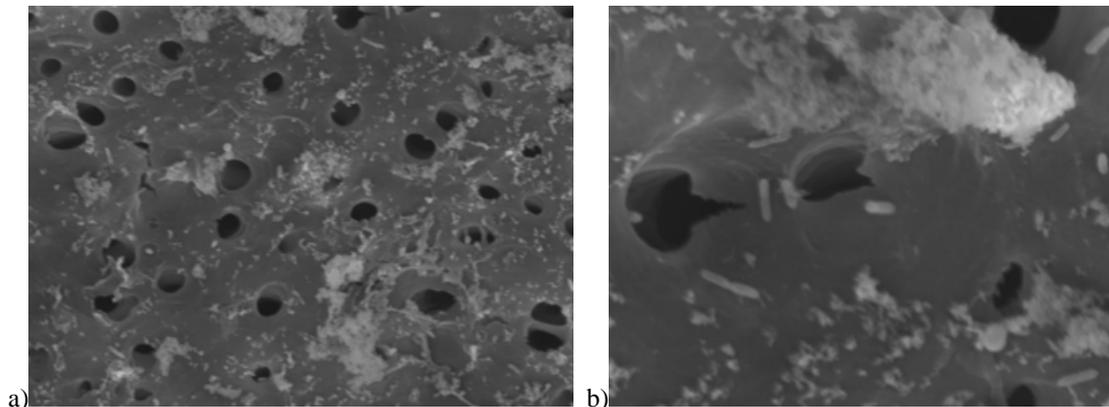


En la imagen a) podemos ver claramente la superficie dentinaria con casi ningún contaminante ni microorganismos, al igual que en la imagen b) en la que observamos los túbulos dentinarios prácticamente limpios.

Tabla 15: Resultados de la TFD respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
TFD	1	-2,125 \pm 4,104	0,985
	2	0,589 \pm 4,271	1
	4	-3,855 \pm 4,496	0,910
	5	3,307 \pm 4,104	0,927

Figura 29: a) Tercio medio del grupo 3 a 1600x, b) Tercio medio del grupo 3 a 5000x.

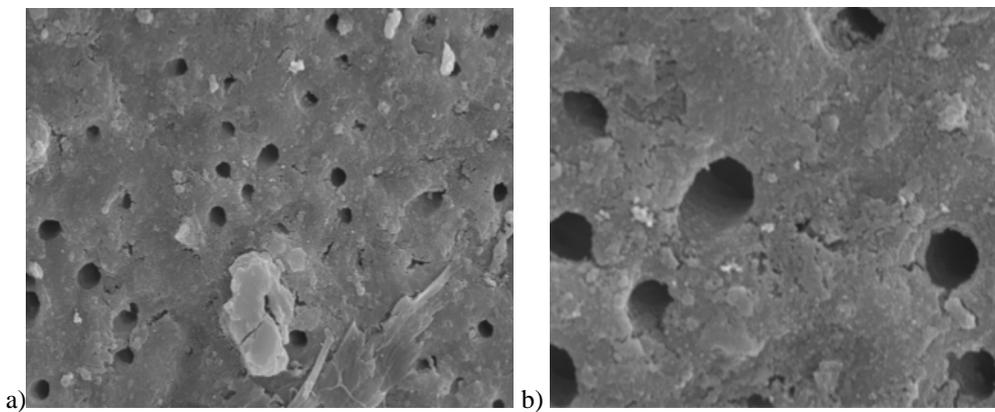


En la imagen a) se observa un mayor grado de contaminación en comparación con el grupo anterior y en la imagen b) se observa con más detalle presencia de microorganismos.

Tabla 16: Resultados del chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey;p< 0.05).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Chitosán 3mg/ml	1	1,730 \pm 4,496	0,995
	2	4,444 \pm 4,650	0,872
	3	3,855 \pm 4,496	0,910
	5	7,163 \pm 4,496	0,514

Figura 30: a) Tercio medio del grupo 4 a 1600x, b) Tercio medio del grupo 4 a 5000x.

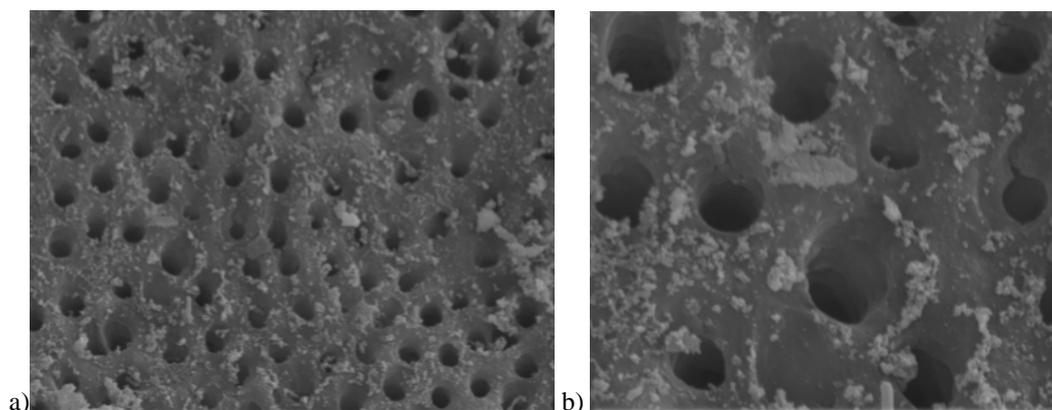


En la imagen a) podemos observar área del tercio medio prácticamente no contaminada al igual que en la imagen b) tomada a un aumento mayor.

Tabla 17: Resultados de TFD + Chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey;p< 0.05).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 5	1	-5,432 \pm 4,104	0,679
	2	-2,718 \pm 4,271	0,968
	3	-3,307 \pm 4,104	0,927
	4	-7,162 \pm 4,496	0,514

Figura 31: a) Tercio medio del grupo 5 a 1600x, b) Tercio medio del grupo 5 a 5000x.



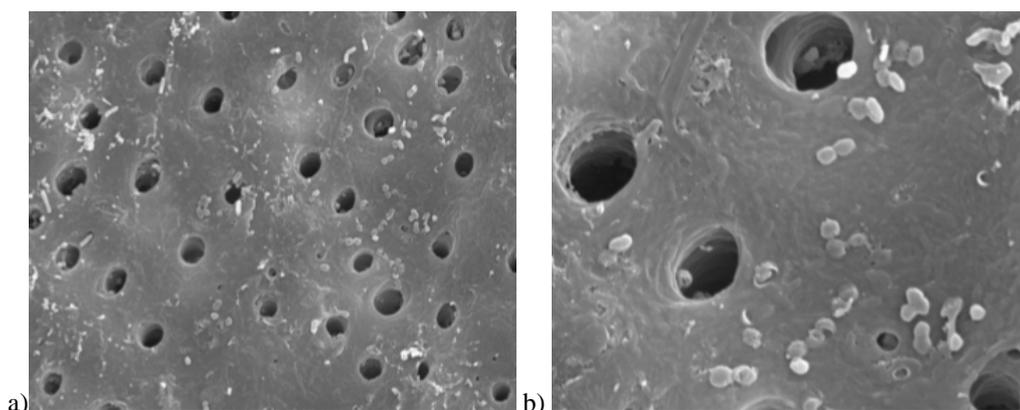
En la imagen a) se puede ver un mayor grado de contaminación con respecto al grupo anterior confirmándose con la imagen b) en la que se observa más detalladamente los túbulos dentinarios rodeados por barrillo dentinario.

Respecto al tercio apical los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas del grupo control respecto al resto de grupos como en los tercios anteriores (ver tabla 18 y figura 32).

Tabla 18: Resultados del grupo control respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo Control	2	4,974 \pm 3,503	0,621
	3	2,291 \pm 3,365	0,959
	4	2,826 \pm 3,687	0,938
	5	6,242 \pm 3,365	0,365

Figura 32: a) Tercio apical del grupo 1 a 1600x, b) Tercio apical del grupo 1 a 5000x.



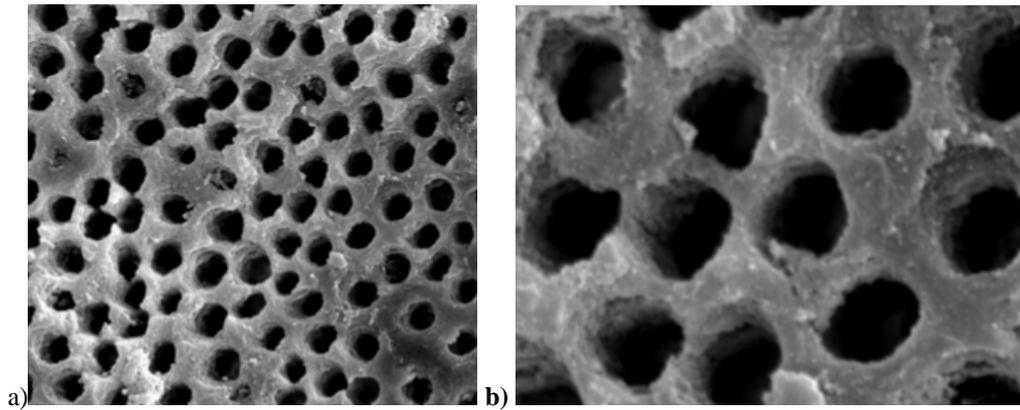
En la imagen a) podemos observar el área apical con presencia de microorganismos y en la imagen b) se ve con más claridad los túbulos dentinarios con *Streptococcos* alrededor.

No existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio (ver tablas 19, 20, 21 y 22 y figuras 33, 34, 35 y 36).

Tabla 19: Resultados del NaOCl al 2.5% respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 2	1	-4,974 \pm 3,503	0,621
	3	-2,683 \pm 3,503	0,938
	4	-2,148 \pm 3,812	0,979
	5	1,267 \pm 3,503	0,996

Figura 33: a) Tercio apical del grupo 2 a 1600x, b) Tercio apical del grupo 2 a 5000x.

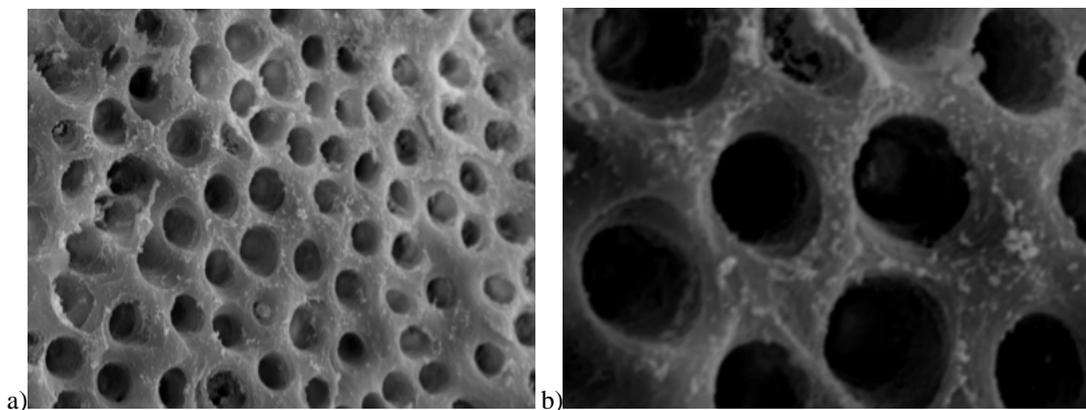


En la imagen a) podemos observar túbulos dentinarios de la zona apical con apenas grado de contaminación así como en la imagen b).

Tabla 20: Resultados de la TFD respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 3	1	-2,291 \pm 3,365	0,959
	2	2,683 \pm 3,503	0,938
	4	0,535 \pm 3,687	1
	5	3,951 \pm 3,365	0,766

Figura 34: a) Tercio apical del grupo 3 a 1600x, b) Tercio apical del grupo 3 a 5000x.

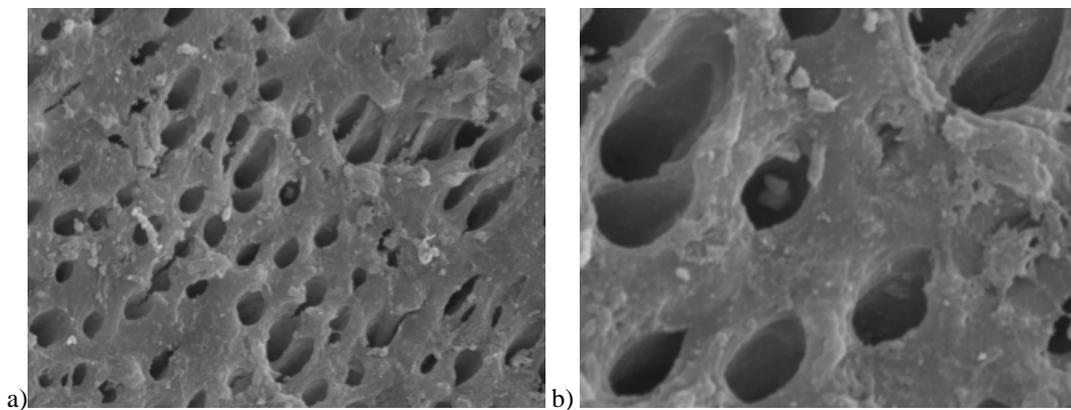


En la imagen a) observamos los túbulos dentinarios sin apenas contaminación como en el grupo anterior al igual que en en la imagen b) tomada a mayor aumento.

Tabla 21: Resultados del chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 4	1	-2,826 \pm 3,687	0,938
	2	2,148 \pm 3,812	0,979
	3	-0,535 \pm 3,687	1
	5	3,415 \pm 3,687	0,884

Figura 35: a) Tercio apical del grupo 4 a 1600x, b) Tercio apical del grupo 4 a 5000x.

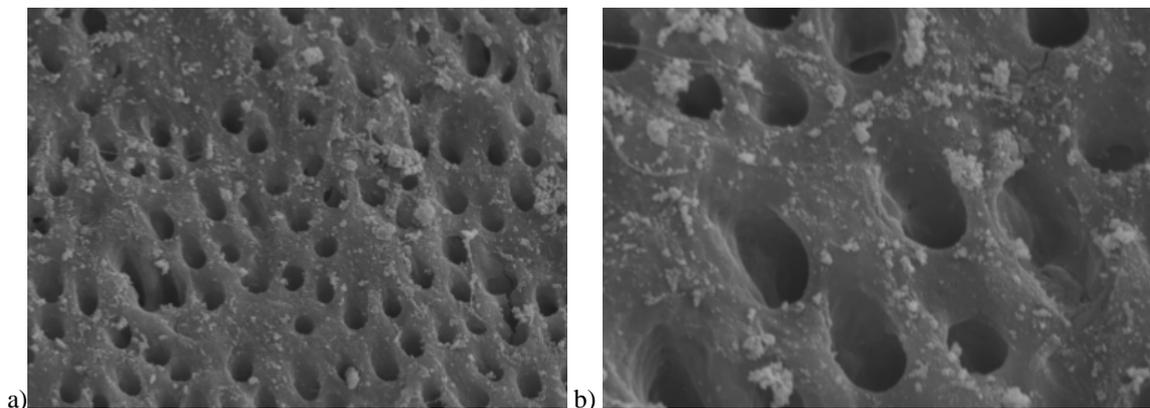


En la imagen a) podemos observar zona del tercio apical del grupo 4 con cierto grado de contaminación al igual que en la imagen b) con más detalle.

Tabla 22: Resultados de TFD+ Chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 5	1	-6,242 \pm 3,265	0,365
	2	-1,267 \pm 3,503	0,996
	3	-3,951 \pm 3,365	0,766
	4	-3,415 \pm 3,687	0,884

Figura 36: a) Tercio apical del grupo 5 a 1600x, b) Tercio apical del grupo 5 a 5000x.



En la imagen a) podemos observar zona del tercio apical del grupo 5 con un mayor grado de contaminación alrededor de los túbulos dentinarios en comparación con el grupo anterior así como en la imagen b), en la que podemos distinguirlo con más detalle.

Asimismo, los resultados obtenidos en el estudio del área total de cada uno de los dientes, mostraron que no existen diferencias significativas del grupo control respecto al resto de grupos como en los casos anteriores (ver tabla 23).

Tabla 23: Resultados del grupo control respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo control	2	2,952 \pm 3,694	0,929
	3	2,064 \pm 3,550	0,977
	4	-0,750 \pm 3,888	1
	5	5,745 \pm 3,550	0,499

No existen diferencias significativas entre el resto de grupos de estudio (ver tablas 24,25,26,27).

Tabla 24: Resultados del NaOCl al 2.5% respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 2	1	-2,952 \pm 3,694	0,929
	3	-0,887 \pm 3,694	0,999
	4	-3,701 \pm 4,020	0,886
	5	2,793 \pm 3,694	0,941

Tabla 25: Resultados de la TFD respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 3	1	-2,064 \pm 3,550	0,977
	2	0,888 \pm 3,694	0,999
	4	-2,814 \pm 3,888	0,949
	5	3,681 \pm 3,550	0,836

Tabla 26: Resultados del chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 4	1	0,750 \pm 3,888	1
	2	3,701 \pm 4,020	0,886
	3	2,814 \pm 3,888	0,949
	5	6,495 \pm 3,888	0,468

Tabla 27: Resultados de TFD+ Chitosán 3mg/ml respecto al resto de grupos. (Test de comparaciones múltiples de Tukey; $p < 0.05$).

Variable de estudio	Grupos de estudio	Diferencia de medias \pm DT	p-valor
Grupo 5	1	-5,745 \pm 3,550	0,499
	2	-2,793 \pm 3,694	0,941
	3	-3,681 \pm 3,550	0,836
	4	-6,495 \pm 3,888	0,468

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. Discusión del método

En el tratamiento endodóntico convencional, la reducción de la carga bacteriana es lograda por una combinación de instrumentación mecánica, varias soluciones de irrigación, y medicamentos antimicrobianos o preparaciones colocadas en el interior del canal (Garcez y cols., 2004).

El *Enterococcus faecalis* es el microorganismo que con mayor frecuencia se encuentra tras los tratamientos de periodontitis apicales, hasta nueve veces más, es por ello que se utiliza como un valioso marcador microbiológico para estudios in Vitro, por su gran capacidad de adhesión a los túbulos dentinarios, resistencia e invasión del canal radicular de forma satisfactoria (Sakamoto y cols., 2006; Vaziri y cols., 2012).

Para nuestro estudio hemos utilizamos *E.faecalis* cepa ATCC 2912 que se cultivó de forma pura en 1ml de BHI hasta conseguir una turbidez óptica de 1 McFarland estándar que corresponde a 3×10^8 cel/ml y se incubó a 37°C durante 1 h. En un estudio realizado por Garcez y cols. (2004) en el que empleó *E.faecalis* por ser uno de los patógenos más relevantes en la endodoncia, se observó que la colonización de la microflora en un conducto radicular de un diente extraído era complicada de realizar pues exige la existencia de unas instalaciones microbiológicas en las proximidades de los centros donde se realiza el estudio para asegurar que los microorganismos no mueran en el traslado.

Para llevar a cabo la terapia fotodinámica hemos empleado un láser de diodo de mano con una longitud de onda de 660nm y un potencial de 100mW y el azul de toluidina como fotosensibilizante. Garcez y cols. (2004) emplearon una fibra óptica para tener acceso al conducto radicular y utilizando la misma metodología para la irradiación (60 segundos) obtuvieron buenos resultados que se atribuyen a que el empleo de una fibra óptica puede mejorar la irradiación de los conductos radiculares pues la fibra probablemente distribuye homogéneamente la luz dentro del conducto lo que garantiza una mejor fotoreacción, confirmando así que la TFD resulta eficaz frente agentes bacterianos.

Al inicio se usaba la eosina como fotosensibilizador y la irradiación empleada era la fuente de luz blanca.

En el intento de optimizar y estandarizar la TFD, en los años posteriores, fueron ensayadas varias sustancias fotosensibilizantes, principalmente, las porfirinas. Los primeros experimentos fueron realizados, en 1911, con la hematoporfirina y, desde entonces, las porfirinas se mantuvieron como las sustancias más eficaces y más estudiadas en la TFD. Hausman describió la capacidad de la hematoporfirina, activada por la luz, de fotosensibilizar a ratones y conejillos de indias. En 1913, Meyer-Betz demostró que la hematoporfirina podía producir fotosensibilidad en humanos, al inyectarse a sí mismo este compuesto y notar inflamación y dolor en las zonas de su cuerpo expuestas a la luz (Nestor y cols., 2006).

Nunes y cols. (2011) utilizaron azul de metileno y un láser diodo de longitud de onda de 660-nm para la TFD y obtuvieron unos resultados que demostraban su eficiencia antimicrobiana para los grupos expuestos a irradiación durante 90 s y 180s.

Souza y cols. (2010) divulgaron que la terapia fotodinámica junto con el azul de metileno o con azul de toluidina no tenía un efecto significativo adicional a la preparación quemo-mecánica que usa el NaOCl al 2.5% como irrigante en la reducción de las poblaciones de *E. faecalis*. De la misma forma Seal y cols. (2002) indicaron que la irrigación con hipoclorito de sodio al 3% en un tratamiento endodóntico convencional eliminó un mayor número de microorganismos que la TFD combinada con 100 g / ml de azul de toluidina y 21 J de luz láser con 632 nm de longitud de onda. Asimismo un estudio de Garcez y cols. (2007) sugiere que el uso de la TFD como adyuvante al tratamiento endodóntico resulta eficaz para reducir de forma significativa la carga bacteriana de los conductos radiculares en comparación con un tratamiento de conductos sin ella; además señaló que el *E. faecalis* es 100-1.000 veces más sensible a la TFD que otras especies Gram-negativas, tales como *P. aeruginosa*, lo que la hace idónea para eliminar a este tipo de microorganismo.

En un estudio acerca de la eliminación de *S. mutans* por medio de TFD, Rolim y cols. (2012) examinaron la actividad antimicrobiana de diversos fotosensibilizadores contra este microorganismo mediante el análisis de la generación de O₂ e informaron que entre los fotosensibilizadores azul de metileno, azul de toluidina, verde malaquita,

eosina, eritrosina y rosa de Bengala, el azul de toluidina es el único fotosensibilizador que reduce efectivamente, 99.9%, el *S. mutans*. Zanim y cols. (2006) usaron azul de toluidina a una concentración de 0.1 mg/ml combinado con luz LED para conseguir la fotodestrucción del biofilm oral, consiguiendo efectos significativos en la reducción de la carga bacteriana de *S. mutans*. Además, en otra investigación Lima y cols. (2009) confirmaron que el uso de TFD con azul de toluidina como fotosensibilizante era efectivo en la eliminación de microorganismos orales presentes en la caries dentinaria producida in situ además de una técnica exitosa en la eliminación de caries previamente a su restauración. Vahabi y cols. (2011) declararon que sólo el empleo de TFD con azul de toluidina al 0.1 % y un láser de diodo de 633 nm en 3 J/cm² era eficaz en la eliminación *S. mutans*. Sin embargo en un estudio in vivo de Bonsor y cols. (2006) la utilización de cloruro de tlonio como fotosensibilizante y un láser de diodo acoplado con una fibra óptica como una fuente de iluminación, resultó idónea en la eliminación de todos los microorganismos encontrados en la infección inicial de los conductos radiculares.

En un estudio acerca del efecto in vitro de la terapia fotodinámica antimicrobiana con verde de indocianina (ICG) en *Enterococcus faecalis* realizado por Chiniforush y cols. (2016) se observó que usando ICG junto TFD, en unas cantidades de 25 a 2000 mg / ml y de 50 a 2000 mg / ml hubo una reducción significativa en el crecimiento de *E. faecalis*. Además mostró un efecto significativamente inhibitorio sobre la formación de biofilms de *E. faecalis* en una concentración de 6-2000 mg / ml y 100 a 2000 g / ml en todos sus grupos de estudio. Y el desarrollo del biofilm fue evitado por concentraciones de 12 a 2000 mg / ml y 100 a 2000 g / ml. De la misma forma la degradación biofilm aumentó con concentraciones de 12 a 2000 mg / ml y 250 a 2000 g / ml en grupo de trabajo y control respectivamente.

En un estudio realizado por Tuncay y cols. (2015) se usó el ozono como agente antibacteriano y se observó que el O₃ tuvo un importante efecto antibacteriano por la eliminación de aproximadamente el 91% de biofilms de *E. faecalis* en 2 minutos. Asimismo Case y cols. (2012) informaron de que la exposición a aire enriquecido con O₃ por un período total de 2 min resultó en una reducción 71,6% en CFU, pero no fue superior al resultado obtenido con 1% NaOCl. Üreyan y cols. (2014) investigaron el efecto de O₃ y plasma a baja temperatura a presión atmosférica (LTAPP) como una

alternativa para NaOCl. Según los resultados del estudio, la aplicación de O₃ durante 2 min no tenía un efecto mayor que LTAPP y 2,5% NaOCl.

En nuestro estudio hemos realizado un análisis de imagen con sistema MEB sobre la base de la metodología propuesta por Estrela y cols. (2012), en las que hemos observado los tres tercios de cada diente a partir de dos aumentos diferentes 1600x y 5000x con el fin de evaluar el nivel de contaminación por *E.fecaelis*.

Estos autores proponen un ensayo preliminar, el análisis MEB tuvo como objetivo determinar un parámetro inicial para la desinfección con NaOCl al 2,5% y cloruro de cetilpiridinio al 0,1%, pero tras la obtención de las imágenes a 1.600 y 5.000 aumentos, no utilizaron la histomorfometría y sus resultados se basaron exclusivamente en la presencia o ausencia de contaminación y residuos. Este software de histomorfometría permite el uso de una variable cuantitativa (porcentaje del área con la contaminación y los residuos en relación con la superficie total de la imagen en estudio). Sin embargo, la metodología propuesta por MEB de Estrela y cols., (2012) tiene una importante limitación que no se resuelve mediante el uso de este software.; esta limitación es la incapacidad para distinguir entre la contaminación y los residuos. Por otro lado, el uso del MEB en tales estudios se ha cuestionado recientemente debido principalmente a la limitación de las imágenes de dos dimensiones (Ehsani y cols., 2013), pero el modelo experimental ideal para evaluar la eliminación de la capa de barrillo no está disponible actualmente. Estos autores, describen un método μ CT que puede proporcionar datos tridimensionales pero no en el nivel del MEB.

V.2. Discusión de los resultados

En este estudio se ha observado que el uso de la TFD disminuye significativamente la carga bacteriana de los conductos radiculares infectados por *E.fecaelis* con respecto al grupo control, aunque no hay diferencias significativas respecto al NaOCl al 2.5% ni con el chitosán 3mg/ml lo que nos hace pensar que a pesar de ser un tratamiento eficaz no supone ningún beneficio mucho mayor sobre cualquier otro desinfectante de los empleados en este estudio. En un estudio similar realizado por Vaziri y cols. (2012) se observaron resultados parecidos a los nuestros con la excepción de que en este estudio Vaziri y cols. (2012) añadieron dos grupos nuevos de trabajo

clorhexidina al 2% y TFD+ NaOCl que resultó ser más eficaz que el resto de sus tratamientos, concluyendo que la reducción del número de UFC era estadísticamente significativa bajo el uso de varios métodos como clorhexidina, NaOCl, laser + NaOCl, y TFD+NaOCl contra *E. faecalis*. Sin embargo, no encontró células viables con la combinación TFD+NaOCl. Este mismo resultado lo obtuvo Tennes y cols. (2014) con su estudio acerca de los efectos de la terapia fotodinámica con el que observó que el tratamiento de los conductos radiculares usando únicamente la TFD causó una notable reducción de la carga bacteriana de *E. faecalis* (92,7%), pero al combinar la terapia con hipoclorito de sodio al 3% la viabilidad bacteriana se redujo en un 99,9%.

En un estudio ex vivo realizado por Hecker y cols. (2013) en el que comparaban el nivel de desinfección bien por hipoclorito de sodio o por terapia fotodinámica en conductos radiculares infectados artificialmente por *Enterococcus faecalis* se observó que la terapia fotodinámica no alcanzó un efecto antibacteriano suficiente en comparación con el hipoclorito sódico.

Nikolaos y cols. (2006), llegaron a la conclusión de que la TFD puede ser desarrollada como un procedimiento adyuvante para matar las bacterias residuales en el sistema de conductos radiculares después del tratamiento endodóntico estándar.

Jacob Lee Fimple y cols. (2008) investigaron los efectos fotodinámicos de azul de metileno en biofilms de múltiples especies como *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* en los conductos radiculares infectados experimentalmente en dientes humanos extraídos. Ellos lograron una reducción de hasta el 80% de las unidades formadoras de colonias y concluyeron que la TFD puede ser un complemento eficaz para el tratamiento antimicrobiano estándar. Vaziri y cols. (2012), llevaron a cabo un estudio sobre 60 dientes con raíces individuales y se encontró que la combinación de la terapia fotodinámica y el 2,5% NaOCl logra una máxima reducción de bacterias. Después del tratamiento por TFD + 2,5% NaOCl, no se observaron bacterias viables.

Javed F y cols. (2013) declararon que la TFD ayuda significativamente en la reducción de las bacterias periodontopatogénicas incluyendo *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Aggregatibacter*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, etc. La TFD mata las bacterias cariogénicas (por ejemplo, *Streptococcus*

mutans y *Streptococcus sanguis*), las bacterias asociadas con conductos radiculares infectados, y los asociados con periimplantitis. Garcez y cols. (2006) usaron TFD junto con el tratamiento endodóntico convencional in vivo y concluyó que conduce a TFD importante reducción de recuento microbiano. La TFD es un tratamiento eficaz para matar los microorganismos que tienen resistencia a múltiples fármacos.

Meire y cols. (2012) demostraron que el tratamiento con una solución de NaOCl 2,5% durante al menos 5 min dio lugar a la completa eliminación de biofilm. Cuando estaban usando una solución al 0,5%, se requirieron 30 min. Mientras tanto, Yao y cols. mostraron que a pesar del efecto proteolítico de NaOCl al 5,25%, todavía había bacterias en los túbulos profundos y en las irregularidades de los conductos debido a la complejidad en el sistema radicular.

Un estudio de Garcez y cols. (2008) sin embargo obtuvo como resultados que la TFD fue más eficaz que el NaOCl, mientras que Navarro y cols. (2010) afirmaron que el NaOCl era un irrigante muy eficaz para eliminar microorganismos comparable a cualquier técnica. Yildirim y cols. (2013) también obtuvieron como resultados que no existía diferencia significativa entre los grupos de tratamiento aunque observó un porcentaje más reducido de bacterias en el caso del grupo de tratamiento que utilizó la TFD.

El *E. faecalis* es capaz de sobrevivir largos períodos de tiempo sin nutrientes; invade túbulos dentinarios (donde puede persistir a profundidades de más de 300 micras) (Peters y cols., 2001), que lo protegen de los agentes de irrigación habituales (Love y cols., 2001). Por esta razón, la capacidad de penetración de la terapia con láser (TFD) puede reducir la tasa de fracaso en los tratamientos de endodoncia. La concentración de *E. faecalis* dentro de los conductos radiculares se podrían reducir en un 97,1% si se trata con TFD durante 30 segundos o al 99,9% si se trata con NaOCl seguido por TFD (también durante 30 segundos) según un estudio de Ríos y cols. (2011).

En nuestro estudio también hemos empleado chitosán en solución acuosa con una concentración de 3mg/ml con el que hemos conseguido reducir significativamente la carga bacteriana respecto al grupo control con ello pensamos que podríamos emplearlo como antibacteriano aunque de la misma forma que en el caso de la TFD no

supone ningún beneficio superior a los que podríamos obtener con el hipoclorito de sodio. DaSilva y cols. (2013) y Silva y cols. (2012) observaron en sus estudios con dientes bovinos extraídos, que la carga bacteriana de los mismos también disminuía con el empleo del quitosán. Fernandes y cols. (2010) afirmaron con su estudio que el quitosán demostró poseer una elevada capacidad antimicrobiana sobre todo en bacterias Gram positivas y levaduras. Y en un estudio de Jeon y cols. (2014) también se demostró su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*. Además Costa y cols. (2014) observaron que el quitosán mostró un gran potencial como posible agente anti-candidiasis, ya que era activo frente *C. albicans* en su estado planctónico con una actividad significativa en sus fases de adhesión, formación, madurez y co-agregación en la formación de biofilm.

En nuestra investigación hemos observado que la combinación de la TFD+ quitosán ha resultado ser la más efectiva reduciendo significativamente la carga bacteriana de *E. faecalis* respecto al grupo control coincidiendo con el estudio de DaSilva y cols. (2013) en el que también se emplea las dos sustancias juntas obteniendo de igual manera una disminución de la carga bacteriana más potente que con el uso de la TFD o quitosán por separado. El uso de esta sustancia en combinación con la TFD puede explicarse debido a que la primera generación de los agentes fotoestimuladores presentaban muchos inconvenientes (Schuitmaker y cols., 1996), situación que ha llevado a la búsqueda de nuevas sustancias que permitan aumentar los efectos antimicrobianos. Quitosán es una de estas sustancias, se trata de un polímero policatiónico natural proveniente de N-acetil-D-glucosamina y β -1.4-D-glucosamina. El policatiónico natural de quitosán interfiere con la carga negativa residual de macromoléculas en la pared celular, lo cual puede explicar su habilidad para potenciar la inactivación fotodinámica del fotoestimulador (Muzzarelli y cols., 1990; Helander y cols., 2001). Además de la bien conocida acción antimicrobiana del quitosán, y su acción frente a hongos, bacterias y virus (Muzzarelli y cols., 1990; Rabea y cols., 2003; Yilmaz, 2004), la combinación de un agente fotosensibilizador con un polímero natural bioactivo como el quitosán con su habilidad inherente para permeabilizar a través de la membrana celular e interactuar con la estructura celular del biofilm, aumenta la eficacia antibiofilm de la TFD (Liu y cols., 2004). La unión de quitosán y agente fotosensibilizante podría reducir la toxicidad del fotosensibilizante aumentando más la acción diana de la terapia fotodinámica (Shrestha y Kishen, 2012).

Son numerosos los estudios que ponen de manifiesto la efectividad de la Terapia Fotodinámica junto a chitosán para el tratamiento del cáncer bucal (Miranda y cols., 2014). El chitosán es un polímero bioadhesivo que actúa como film, es biocompatible y biodegradable y presenta interacciones electrostáticas que potencian las fuerzas bioadhesivas (Wang y cols., 2007). Aumenta la mucoadhesión entre los polímeros y los fármacos aplicados al tumor. Además favorece la penetración de varias drogas o fármacos hidrofílicos, aumentando la absorción de estos en la mucosa oral y neutralizando las fuerzas aniónicas de estas células de la mucosa (Sandri y cols., 2005). Otra propiedad importante es que el chitosán es un inmunoadyuvante, es decir estimula la respuesta inmune del huésped frente al efecto fotodestructivo de la TFD en el tratamiento de células tumorales (Chen y cols., 2002).

Finalmente debemos decir que en nuestro estudio, la combinación de TFD+ Chitosán mostró la mayor reducción en la infección establecida por *E.fecaelis* comparado con el tratamiento de TFD o Chitosán por separado e incluso al compararlo con el tratamiento convencional “gold standard” con NaOCl al 2.5%. Sin embargo y a pesar del posible efecto potenciador del chitosán sobre el fotosensibilizante azul de metileno para el tratamiento antibacteriano de *E.fecaelis* con TFD en endodoncia, no se ha observado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento usados, por lo que son necesarios futuros estudios que demuestre dicho efecto potenciador.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

A continuación se describen las conclusiones obtenidas del trabajo:

1. Al analizar el efecto del NaOCL, la TFD y el chitosán por separado y la combinación de TFD + chitosán sobre las UFC de *E. faecalis* en canales radiculares de dientes humanos previamente infectados, observamos que la mayor reducción de UFC se obtuvo al combinar la TFD con chitosán por lo que el chitosán puede ser un posacárido natural con efecto potenciador del FS azul de metileno en el tratamiento endodóntico de TFD contra *E. faecalis*.
2. La combinación de TFD + chitosán produce una mayor reducción sobre la contaminación bacteriana y el barrillo dentinario en los canales radiculares de dientes humanos previamente infectados con *E. faecalis*, siendo más efectivo que el uso individualizado de TFD o chitosán, e incluso que la aplicación del irrigador “gold standard” NaOCL al 2,5%.

VII. REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. *J Endod* 1981; 7:376-7.
2. Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod* 2002; 28:163-7.
3. Arweiler NB, Pietruska M, Skurska A y cols. Nonsurgical treatment of aggressive periodontitis with photodynamic therapy or systemic antibiotics. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2013; 123:532-44.
4. Austin JH, Taylor HD. Behavior of Hypochlorite and of Chloramine-T Solutions in Contact with Necrotic and Normal Tissues in Vivo. *J Exp Med* 1918; 27:627-33.
5. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent* 2008; 36:104-16.
6. Balata ML, Andrade LP, Santos DB y cols. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial *J Appl Oral Sci.* 2013; 21:208-14.
7. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 2005; 100:114-7.
8. Bansal R, Jain A. Overview on the current antibiotic containing agents used in endodontics. *N Am J Med Sci.* 2014; 6:351-8.

9. 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; 96:618-24.
10. Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RN. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *J Endod* 2010; 36:312-4.
11. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod* 2003; 29:334-7.
12. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 1999; 181:4725-33.
13. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006; 37:425-35.
14. Bonsor SJ, Nichol R., Reid TM, Pearson GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J* 2006; 22:101-5.
15. Camacho-Alonso F, Salmerón-Lozano P, Martínez-Beneyto Y. Effects of photodynamic therapy, 2% chlorhexidine, triantibiotic mixture, propolis and ozone on root canals experimentally infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *Odontology* (In press).
16. Canalda Shali C. y Brau Aguadé. Concepto de endodoncia. Canalda Shali C. y Brau Aguadé. *Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas*. Barcelona: Masson; 2006. P. 1-2.

17. Canalda Shali C. Preparación de los conductos radiculares. Canalda Shali C. y Brau Agudé. Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas. Barcelona: Masson; 2006. p. 159-93.
18. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod* 2012; 38:523-6.
19. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N y cols. Sensitivity of *Candida albicans* Germ Tubes and Biofilms to Photofrin-Mediated Phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4288-95.
20. Chen CP, Chen CT, Tsai T. Chitosan nanoparticles for antimicrobial photodynamic inactivation: characterization and in vitro investigation. *Photochem Photobiol* 2012; 88:570-6.
21. Chen Z y cols. Bisorption of malaquite green from aqueous solution by *Pleurotus ostreatus* using Taguchi method. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2014, 12:63
22. Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N y cols. Evaluation of the bacterial effect of Nd: YAG, Er:YAG, Er, Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Sur Med* 2012; 44:824-31.
23. Cheng M, Chen H, Wang Y y cols. Optimized synthesis of glycyrrhetic acid-modified chitosan 5-fluorouracil nanoparticles and their characteristics. *Int J Nanomedicine* 2014 24; 9: 695-710.

24. Chiniforush N, Pourhajibagher M, Parker S, Shahabi S, Bahador A. The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy with indocyanine green on *Enterococcus faecalis*: Influence of a washing vs non-washing procedure. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016; 16:119-23.
25. Chua y cols. Antifungal effectiveness of various intracanal medicaments against *Candida Albicans*: an ex-vivo study. *BMC Oral Health* 2014; 14:53.
26. Cohen S, Hargraves K y Berman LH. *Vías de la pulpa*. 10ª ed. Barcelona: Elsevier; 2010.
27. Costerton J, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilm: A common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284:1318-22.
28. Cowan M, Taylor KG, Doyle RJ. Energetics of the initial phase of adhesion of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite. *J Bacteriol* 1987; 169:2995-3000.
29. Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 49:175-7.
30. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26:343-56.
31. Dahlen G, Moller A., Jr. Microbiology of endodontic infection. In: Slots J, Taubman MA, editors. *Contemporary Oral Microbiology and immunology*. St. Louis: Mosby year Book Inc; 1991. pp. 444-55.
32. Dakin HD. On the Use of Certain Antiseptic Substances in the Treatment of Infected Wounds. *Br Med J* 1915; 2:318-20.

33. DaSilva L, Finer Y, Friedman S y cols. Biofilm Formation within the Interface of Bovine Root Dentin Treated with Conjugated Chitosan and Sealer Containing Chitosan Nanoparticles. *J Endod* 2013 Feb; 39:249-53.
34. De Sant'Anna GR. Photodynamic Therapy for the Endodontic Treatment of a Traumatic Primary Tooth in a Diabetic Pediatric Patient. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* 2014; 8:56-60.
35. Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on periapical tissues of the Cat. *J Endod* 1980; 7:31-5.
36. Ehsani M, Marashi M, Zabihi E, Issazadeh M, Khafri S. A Comparison between Antibacterial Activity of Propolis and Aloe vera on *Enterococcus faecalis* (an In Vitro Study). *Int J Mol Cell Med* 2013; 2:110-6.
37. Estrela C, Sousa-Nieto MD, Alves DR, Alencar H, Santos TO, Pécora JD. A preliminary study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. *Braz Den J*. 2012; 23:645-53.
38. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* 2003; 29:338-9.
39. Facklam R, Sahm D, Martins L. *Enterococcus*. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover F, Tenover R editors. *Manual of clinical microbiology*. 7th edition. American society of microbiology 1999: 297-305.
40. Fernandes JC, Tavaría FK, Fonseca SC y cols. In Vitro Screening for Antimicrobial Activity of Chitosans and Chitoooligosaccharides, Aiming at Potential Uses in Functional Textiles. *J Microbiol Biotechnol* 2010 Feb; 20:311-8.

41. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001; 27:452-5.
42. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J* 2007; 18:294-8.
43. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F y cols. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. *J Endod* 2008; 34:728-34.
44. Foulkes DM. Some toxicological observations on chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl.* 1973; 12:55-60.
45. Frank SA, Barbour AG. Within-host dynamics of antigenic variation. *Infect Genet Evol.* 2006; 6:141-6.
46. Fujimura T, Mitani A, Fukuda M, Mogi M, Osawa K, Takahashi S y cols. Irradiation with a low-level diode laser induces the development endothelial locus-1 gene and reduces proinflammatory cytokines in epithelial cells. *Lasers Med Sci* 2014; 29:987-94.
47. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 2007; 39:59-66.
48. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR y cols. Antimicrobial Effects of Photodynamic Therapy on Patients with Necrotic Pulps and Periapical Lesion. *J Endod* 2008; 34:138-42.

49. García Delgado A, Martín-González J, Castellanos Cosano L, Martín Jiménez M, Sánchez Domínguez B, SeguraEgea JJ. Sistemas ultrasónicos para la irrigación del sistema de conductos radiculares. *Av. Odontoestomatol* 2014; 30:79-95.
50. Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA – DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16:197-204.
51. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent* 2009; 37:76-81.
52. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. *J Oral Maxillofac Res* 2011; 2:1.
53. Grossman LI. Irrigation of root canals. *J Am Dent Assoc* 1943; 30:1915-17.
54. Halkai R, Hegde MN, Halkai K y cols. Evaluation of the presence of *Enterococcus Faecalis* in root cementum: A confocal laser scanning microscope analysis. *J Conserv Dent* 2014; 17:119-123.
55. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3:436-50.
56. Harn WM, Chen YH, Yuan K, Chung CH, Huang PH. Calculus-like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14:237-40.
57. Hecker S, Hiller KA, Galler KM, Erb S y cols. Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium

- hypochlorite and the photodynamic therapy. *International Endodontic Journal* 2013; 46: 449-457.
58. Heling I, Rotstein I, Dinur T, Szwec-Levine Y, Steinberg D. Bacterial and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro. *J Endod* 2001; 27:278-80.
59. Hogg SD, Whiley RA, De Soet JJ. Occurrence of Lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:62-6.
60. Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74:648-51.
61. Hornef M, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2002; 113:1033-40.
62. Hulsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation-literature review and case reports. *Int Endod J* 2000; 33:186-93.
63. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol* 2005; 54:777-83.
64. Jansen A, Yu J. Differential gene expression of pathogens inside infected hosts. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:138-42.
65. Javed F, Romanos GE. Does photodynamic therapy enhance standard antibacterial therapy in dentistry? *Photomedicine and Laser Surgery*. 2013; 31:512-18.

66. Kantz W, Ferrillo PJ y Zimmermann ER. Cytotoxicity of three endodontic intracanal medicaments. *Oral Surg* 1974; 38:600-604.
67. Kean T, Roth S, Thanou M. Trimethylated Chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. *J Control Release* 2005; 103:643-53.
68. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: Association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91:587-93.
69. Khademi A, Usefian E, Feizianfard M. Tissue dissolving ability of several endodontic irrigants on bovine pulp tissue. *Iran Endod J* 2007; 2:65-8.
70. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY y cols. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg Med* 2011; 43:755-67.
71. Kim JY, Choi WI, Kim M, Tae G. Tumor-targeting nanogel that can function independently for both photodynamic and photothermal therapy and its synergy from the procedure of PDT followed by PTT. *J Control Release* 2013; 171:113-21.
72. Kinder SA, Kornman KS, Hott SC. Characterization of selected oral microorganisms by SDS-PAGE. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4:52-56.
73. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1302-9.
74. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 2005; 19:2645-55.

75. Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Yonezawa H, Ochiai K, Yamamoto M. Characterization of the effects of butyric acid on cell proliferation, cell cycle distribution and apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47:67-74.
76. Kustarci A, Sumer Z, Altunbas D, Kosum S. Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an *ex vivo* study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107:73-9.
77. Lakshmi Narayanan L. and Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent* 2010; 13: 233-239.
78. Lasa I, del Pozo JL., Penadés JR, Leiva J y cols. Bacterial biofilms and infection. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2005; 28: 163-175.
79. Liébana Ureña J. *Microbiología Oral*. 2 ed. Madrid. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. 2002.
80. Lima JP, Sampaio de Melo MA, Borges FM, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre dos Santos M y cols. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries. *Eur J Oral Sci* 2009; 117:568-574.
81. Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3 The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003; 29:565-6.
82. Llamas R, Segura JJ, Jiménez-Rubio A, Jiménez-Planas A. *In vitro* effect of Parachlorophenol and camphorated parachlorophenol on macrophages. *J Endod* 1997; 23:728-730.

83. Love RM. Enterococcus faecalis-a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34:399-405.
84. Love RM. Invasion of dentinal tubules by root canal bacteria. *Endod Top* 2004; 9:52-65.
85. Maekawa LE, Valera MC, De Oliveira LD y cols. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root Canals. *J Appl Oral Sci* 2011; 19:106-12.
86. Maita E, Horiuchi H. Polyamine analysis of infected root canal contents related to clinical symptoms. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6:213-7.
87. Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C y cols. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 2001; 74:105-12.
88. Marotti J, Tortamano P, Cai S y cols. Decontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2013; 28:303-9.
89. Mazariegos DO. La terapia fotodinámica como una alternativa para la enfermedad periodontal. *Odontología Actual* 2008; 60: 5.
90. Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, De Moor JG. Evaluation of Nd: YAG and Er: YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on Enterococcus faecalis biofilms. *Int Endod J* 2012; 45:482-91.
91. Miliani R, Lobo K, Morales OA. Irrigación en endodoncia: Puesta al día. *Acta Bioclinica* 2012; 2.

92. Miranda IS, Pereira R, Junqueira MT, Riemma MB. Chitosan based mucoadhesive films containing 5-am inolevulinic acid for buccal cancer's treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology* 2014; 140:266-75.
93. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J* 2008; 58:329-41.
94. Mohammadi Z, Shalavi S, Soltani MK, Asgary S. A review of the properties and applications of ozone in endodontics: an update. *Iran Endod J* 2013; 8:40-3.
95. Mohanty N, Jalaluddin M, Kotina S y cols. Photodynamic therapy: the imminent milieu for treating oral lesions. *J Clin Diagn Res* 2013; 7:1254-7.
96. Moreno Arias G A, Luna AE, Alvarado Delgadillo A y cols. Photodynamic therapy. *Med Cutan Iber Lat Am* 2007; 35:255-268.
97. Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini, Veraldo PE. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2019-23.
98. Myhre AE, Aasen AO, Thiemermann C, Wang JE. Peptidoglycan - a endotoxin in its own right? *Shock*. 2006; 25:227-35.
99. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:240-6.
100. Nair PN. Apical periodontitis: A dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol*. 2000; 1997;13:121-48.

101. Neringa S, Peciulene V y cols. Susceptibility of Endodontic Pathogens to Antibiotics in Patients with SAP. *J End* 2010; 36:1611-16.
102. Niederman R, Zhang J, Kashket S. Short chain carboxylic acid Stimulated, PMN – mediated gingival inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8:269-90.
103. Nunes MR, Mello I, Franco GC, Photomed Laser Surg y cols. Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. *Photomed Laser Surg* 2011; 29:803-8.
104. Oh IH, Min HS, Li L, Tran TH, Lee YK, Kwon IC y cols. Cancer cell-specific photoactivity of phephorbide a-glycol chitosan nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Biomaterials* 2013; 34:6454-63.
105. Pagonis TC, Chen J, Fontana CR y cols. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J Endod* 2010; 36:322-28.
106. Pavaskar R, Chalakkal P, Krishnan R y cols. Comparing the Effectiveness of Chlorhexidine, Calcium Hydroxide and Linezolid Based Medicaments Against *Enterococcus Faecalis*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014; 8:240-42.
107. Peña A, Sánchez NS, Calahorra M y cols. Effects of Chitosan on *Candida albicans*: Conditions for Its Antifungal Activity. *Biomed Res Int* 2013; 2013:527-49.
108. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001; 27:76-81.

109. Pinheiro SL, Schenka AA, Neto AA, de Souza CP, Rodríguez HM, Ribeiro MC. Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. *Lasers Med Sci* 2009; 24:521-6.
110. Podbielski A, Spahr A y Haller B. Antibacterial Effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and Chlorhexidine. *J End* 2003; 29.
111. Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* 2005; 12:221-8.
112. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod* 2002; 28:634-7.
113. Pumarola Suñé J. Microbiología endodóntica. Canalda Shali C. y Brau Aguadé. *Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas*. Barcelona: Masson; 2006. P. 30-41.
114. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4:1457-65.
115. Rajesh S, Koshi P y Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol*. 2011; 15:323-27.
116. Ramírez Backhaus M, Trassierra Villa M, Vera Donoso CD, Jiménez Cruz JF. Terapia fotodinámica en el cáncer de próstata localizado. *Actas Urol Esp*. 2007; 31:633-41.

117. Ramos IF, Tillmann M, Niraldo P y cols. Histopathological analysis of corticosteroidantibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpectomy: an in vivo study. *J Appl Oral Sci* 2012; 20:50-6.
118. Ricatto LG, Conrado LA, Turssi CP, Franca FM, Basting RT, Amaral FL. Comparative evaluation of photodynamic therapy using LASER or light emitting diode on cariogenic bacteria: An in vitro study. *Eur J Dent* 2014; 8:509-14.
119. Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod* 2011; 37:856-9.
120. Rolim JP, de-Melo MA, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, Souza JR, Nogueira NA, y cols. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 2012; 106:40-106.
121. Salomao K, Dantas AP, Borba CM y cols. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38:87-92.
122. Saini R. Ozone therapy in dentistry: a strategic review. *J Nat Sci Biol Med* 2011; 2:151-3.
123. Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:112-22.

124. Sandri G, Rossi S, Bonferoni MC, Ferrari F, Zambito Y, Di Colo G, Caramella C. Buccal penetration enhancement properties of n-trimethyl chitosan: influence of quaternization degree on absorption of a high molecular weight molecule. *Int J Pharm* 2005; 297:146-155.
125. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 1975; 1:19-21.
126. Schuitmaker JJ, Baas P, van Leengoed HL, van der Meulen FW, Star WM, van Zandwijk N. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J Photochem Photobiol* 1996; 34:3-12.
127. Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An *in vitro* comparison of the bacterial efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int Endod J* 2002; 35:268-74.
128. Seidler V, Linetskiy I, Hubalkova H, Stankova H, Smucler R, Mazanek J. Ozone and its usage in general medicine and dentistry A review article. *Prague Med Rep.* 2008; 109:5-13.
129. Ozbek SM, Ozbek A, Yavuz MS. Detection of human cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis lesions by real-time PCR. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013; 18:811-6.
130. Shah HN, Collins DM. Prevotella, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol* 1990; 40:205-8.
131. Shrestha A, Kishen A. Polycationic chitosan-conjugated photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2012; 88:577-83.

132. Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: A systematic literature review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2013; 10:632-43.
133. Schulz M, Von Arx T y cols. Periapical Lesions Obtained During Apical Surgery. *J End* 2009; 35:634-42.
134. Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J* 2001; 34:120-32.
135. Singh F, Papamanou DA, Song X y cols. Endodontic photodynamic therapy *ex vivo*. *J Endod* 2011; 37:217-22.
136. Siren EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Orstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112:326-31.
137. Soekanto A1, Kasugai S, Mataka S, Ohya K, Ogura H. Toxicity of camphorated phenol and camphorated parachlorophenol in dental pulp cell culture. *J Endod* 1996; 22:284-86.
138. Soukos NS, Chen PSY, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S y cols. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *Journal of Endodontics.* 2006; 32:979-84.

139. Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC y cols. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a suplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010; 36:292-6.
140. Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 36:856-71.
141. Spångberg L, Rutberg M, Rydinge E. Biologic effects of endodontic antimicrobial agents. *J Endod* 1979; 5:166-75.
142. St Denis TG, Dai T, Izikson L y cols. All you need is light Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence* 2011; 2:509-20.
143. Stoll R, Venne L, Jablonski-Momeni A, Mutters R, Stachniss V. The disinfecting effect of ozonized oxygen in an infected root canal: an in vitro study. *Quintessence Int.* 2008; 39:231-6.
144. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB y cols. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32:93-8.
145. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28:304-10.
146. Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA – DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16:191-6.

147. Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tarnvik A. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented bacteroides. *J Med Microbiol* 1985; 19:85-94.
148. Tan H, Rubin JP, Marra KG. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for adipose tissue regeneration *Organogenesis* 2010; 6:173-80.
149. Tandan M, Hegde MN, Hegde P. Effect of four different intracanal medicaments on the apical seal of the root canal system: A dye extraction study. *Indian J Dent Res* 2014; 25:607-12.
150. Tang G, Yip HK, Samaranayake LP, Chan KY, Luo G, Fang HH. Direct detection of cell surface interactive forces of sessile, fimbriated and non-fimbriated *Actinomyces* spp. using atomic force microscopy. *Arch Oral Biol.* 2004; 49:727-38.
151. Tennert C, Feldman K, Haamann E y cols. Effect of Photodynamic Therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. *BMC Oral Health* 2014, 14:132.
152. Torabinejad M, Ung B, Kettering J. Invitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod* 1990; 16:566-9.
153. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3:86-90.
154. Tuncay Ö, Dinçer A, Kuştarıcı A, Er Ö, Dinç G, Demirbuga S. Effects of ozone and photo-activated disinfection against *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *Niger J Clin Pract* 2015; 18:814-8.

155. ÜreyenKaya B, Kececi AD, Güldas HE, Çetin ES, Öztürk T, Öksüz L y cols. Efficacy of endodontic applications of ozone and low-temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Lett Appl Microbiol* 2014; 58:8-15.
156. Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 2005; 160:189-95.
157. Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH y cols. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17:555-9.
158. Vahabi S, Fekrazad R, Ayremlou S, Taheri S, Zangeneh N. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on *streptococcus mutans*: an *in vitro* study. *J Dent (Tehran)* 2011; 8:48-54.
159. Vaziri S, Kangarlou A, Shahbazi R y cols. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an *in vitro* study. *Dent Res J (Isfahan)* 2012; 9:613-18.
160. Velásquez-Reyes V y Álvarez-Páucar M. Reacción de la pulpa dentaria ante la presencia de la caries y los tratamientos dentales. *Odontol. Sanmarquina* 2010; 13:28-31.
161. Vera-Rojas J, Benavides-García M, Moreno-Silva E y Romero-Viñas M. Conceptos y técnicas actuales en la irrigación endodóntica. *Endodonda* 2012; 30:31-44.

162. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 2008; 73:117-24.
163. Wang JE, Jørgensen PF, Ellingsen EA, Almiöf M, Thiemermann C, Foster SJ, y cols. Peptidoglycan primes for LPS – Induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood 2001; 16:178-82.
164. Wang CR, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *J Endod* 2007; 33:1283-9.
165. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilm to antimicrobial agents. *J Med Microbial* 1996; 44:79-87.
166. Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S y cols. Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. *Eur J Dent* 2013; 7:469-73.
167. Yilmaz E. Chitosan: a versatile biomaterial. *Adv Exp Med Biol* 2004; 553:59-68.
168. Yuichiro Noiri, Atsushi Ehara, Takashi Kawahara y cols. Participation of Bacterial Biofilms in Refractory and Chronic Periapical Periodontitis. *J End* 2002; 28.
169. Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci* 2006; 114:64-69.

170. Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94:756-62.
171. Zehnder M, Lehnert B, Schonenberger K, Waltimo T. Irrigants and intracanal medicaments in endodontics. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2003; 113:756-63.
172. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32:289-98.
173. Zhang X, Li Y, Sun X, Kishen A y cols. Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nano-complexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med*. 2014; 25:2619-28.

VIII. ANEXOS

Anexo I

UNIVERSIDAD DE
MURCIAVicerrectoría de
InvestigaciónComisión de
Ética de
Investigación

CAMPUS MARE NOSTRUM

**INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
DE LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA**

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia

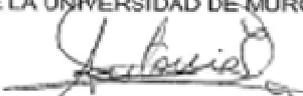
CERTIFICA:

Que D^{ra}. Yolanda Martínez Beneyto ha presentado el proyecto de investigación titulado "Uso de la terapia fotodinámica y el chitosan en endodoncia", a la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

Que la dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día 16 de octubre de 2014, por unanimidad, se emite Informe INFORME FAVORABLE.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión, en Murcia a 17 de diciembre de 2014.

Vº Bº
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN
DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA


Fdo.: Antonio Juan García Fernández



Anexo II



**XXII Congreso Nacional de la
Sociedad Española de
Epidemiología y Salud Pública Oral**

11-12 NOV 2016
MURCIA
Hospital General Universitario

D. Antonio José Ortiz Ruiz, Presidente del Comité Científico y Dña. Yolanda Martínez Beneyto, Presidenta del Comité Organizador del **XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral**, celebradas del **11 a 12 de noviembre de 2015** en el Hospital General Universitario Morales Meseguer.

Certifican que la COMUNICACIÓN ORAL con el título:

**USO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA Y OTROS AGENTES
DESINFECTANTES FRENTE A ENTEROCOCCUS FECALIS**

Realizada por los autores:

**Julián Belmonte, Encarnación; Salmerón Lozano, Pablo; Pérez
Silva, Amparo; Camacho Alonso, Fabio**

Recibe el premio a la mejor comunicación oral del Congreso.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Murcia a doce de noviembre de dos mil dieciséis.



Fdo. Antonio José Ortiz Ruiz
Presidente Comité Científico



Fdo. Yolanda Martínez Beneyto
Presidenta del Comité Organizador

Secretaría Técnica: Evencia en Salud
www.evenciaen.com Tel: +34 968 50 25 00
Inscrita en el Registro de Actividades Turísticas CPC 49/009

Anexo III

Format: Abstract ▾

Send to ▾

Photomed Laser Surg. 2017 Jan 9. doi: 10.1089/pho.2016.4148. [Epub ahead of print]

Bactericidal Efficacy of Photodynamic Therapy and Chitosan in Root Canals Experimentally Infected with *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study.

Camacho-Alonso F¹, Julián-Belmonte E², Chiva-García F³, Martínez-Benevto Y⁴.

Ⓜ Author information

Abstract

OBJECTIVE: To evaluate the antibacterial efficacy of photodynamic therapy (PDT) and chitosan against *Enterococcus faecalis* and assess the possible enhancive effect of chitosan on the photosensitizer methylene blue in experimentally infected root canals of extracted human teeth in vitro.

BACKGROUND DATA: *E. faecalis* is frequently found in persistent endodontic infections. In this context, the antimicrobial PDT or newer antibacterial alternatives such as chitosan could become modern alternatives to existing antibacterial treatment approaches.

METHODS: One hundred two single-rooted extracted teeth were used. The teeth were contaminated with 0.1 mL *E. faecalis* (3×10^8 cell/mL). These were randomized into six treatment groups (n = 17 teeth): Group 1 (2.5% NaOCl); Group 2 (PDT); Group 3 (chitosan 3 mg/mL); Group 4 (PDT+chitosan 3 mg/mL); Group 5 (positive control, no treatment); and Group 6 (negative control, no inoculation, no treatment). The canal content was sampled with sterile paper points. The samples were cultured on blood agar plates to determine the number of colony-forming units (CFU)/mL. Five teeth in each group were analyzed by scanning electron microscope (SEM) to determine the percentage of area with contamination and debris.

RESULTS: The positive control group showed the highest number of CFU/mL, with statistically significant differences in comparison with the other treatment groups ($p \leq 0.05$). Group 4 (PDT+chitosan) showed the lowest CFU/mL count, followed by Group 2 (PDT alone), which obtained similar results to Group 1 (NaOCl), but there was no significance between the treated groups. SEM images showed that Group 4 (PDT+Chitosan) showed the lowest area of contamination.

CONCLUSIONS: Combination of PDT and chitosan showed antibacterial potential against endodontic infection by *E. faecalis*.

KEYWORDS: *Enterococcus faecalis*; chitosan; endodontic; infected root canals; photodynamic therapy

PMID: 28068186 DOI: [10.1089/pho.2016.4148](https://doi.org/10.1089/pho.2016.4148)