



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de
Odontología
UNIVERSIDAD DE
LA REPÚBLICA

Comparación del efecto antimicrobiano de hipoclorito de sodio, agua superoxidizada y terapia fotodinámica frente al *Enterococcus faecalis* en Endodoncia. Estudio *in vitro*.

Tesis de Maestría

Maestría en Ciencias Odontológicas: Opción Biología Oral

Escuela de Graduados – Facultad de Odontología

Universidad de la República

Maestrando: Dr. Martín Puch

Tutora: PhD. Profa. Dra. Beatriz Vilas

2024

TÍTULO

Comparación del efecto antimicrobiano de hipoclorito de sodio, agua superoxidizada y terapia fotodinámica frente al *Enterococcus faecalis* en Endodoncia. Estudio *in vitro*.

EQUIPO RESPONSABLE

Autor: Dr. Martín Puch

Tutora: PhD. Profa. Dra. Beatriz Vilas

Microbiología: Asist. Dra. Lourdes Zaffaroni

Estadística: Prof. Agdo. Dr. Ramón Álvarez

CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN

Maestría en Ciencias Odontológicas: Opción Biología Oral. Facultad de Odontología, Udelar, 2024

Resumen

Uno de los desafíos es combatir al *Enterococcus faecalis* en el campo de la endodoncia debido a su capacidad de resistir a diversos tratamientos antimicrobianos y su implicancia en el fracaso de los tratamientos endodónticos. *E. faecalis* es una bacteria grampositiva que puede formar biopelículas en los conductos radiculares, lo que le confiere resistencia a los agentes antimicrobianos y a las defensas del sistema inmunitario del hospedero. Es el microorganismo que se encuentra con más frecuencia en las infecciones secundarias y fracasos endodónticos. **Objetivo:** Comparar la sensibilidad del *Enterococcus faecalis* a tres estrategias antimicrobianas (hipoclorito de sodio 2.5%, agua superoxidizada y PDT). **Método:** Se seleccionaron 100 premolares humanos inferiores, que se instrumentaron con limas Reciproc® 25, luego se contaminaron con un cultivo puro de *E. faecalis*. Se dividieron en 4 grupos de 25 dientes cada uno, donde se aplicaron los diferentes antisépticos. Estos fueron hipoclorito de sodio, agua super oxidizada, terapia fotodinámica y como grupo control, suero fisiológico. **Resultados:** las tres terapias antisépticas lograron reducir el número inicial de microorganismos, siendo el hipoclorito de sodio y la terapia foto dinámica similares en su respuesta y el agua superoxidizada mostró mejores resultados. **Conclusiones:** las tres alternativas pueden utilizarse para el saneado radicular, logrando mejores resultados las combinaciones de las mismas.

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*, sodium hypochlorite, superoxidized water, photochemotherapy.

Tabla de Contenido

Introducción.....	1
Infección en endodoncia.....	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	3
El control de la infección intrarradicular.....	6
Hipoclorito de sodio.....	8
Agua superoxidizada.....	9
Terapia fotodinámica (PDT).....	9
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	11
General.....	11
Específicos.....	11
Metodología.....	12
Resultados.....	17
Discusión.....	19
Conclusiones.....	26
Referencias.....	27
Agradecimientos.....	32
Apéndices.....	33
Anexos.....	36

Introducción

La cavidad bucal es la primera parte del aparato digestivo y está comunicada al exterior por una cavidad séptica. Se encuentra colonizada por la microbiota oral, muchas veces formando microbiomas en equilibrio con el hospedero. Cuando los microorganismos que se encuentran en equilibrio en la cavidad bucal, colonizan estructuras dentales, como los canales radiculares, las zonas periapicales o bolsas periodontales, es que puede desarrollarse la infección odontogénica. Ésta se caracteriza por ser una infección polimicrobiana⁽¹⁾⁽²⁾.

Infección en endodoncia

El conocimiento de la microbiota y el control de la infección de los conductos radiculares, puede llegar a determinar el éxito o el fracaso de los tratamientos endodónticos. Los microorganismos predominantes en la infección endodóntica son los anaerobios facultativos y especies Gram positivas. En la infección secundaria o persistente especialmente se detecta el *Enterococcus faecalis*⁽³⁾⁽⁴⁾. De acuerdo a la gran cantidad de reportes sobre el tema, la prevalencia de fracasos endodónticos oscila entre el 5% y el 10% de los tratamientos⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

Dentro de los factores más frecuentemente asociados al fracaso del tratamiento endodóntico, se encuentra: la persistencia microbiana (intra y extra radicular), la deficiente limpieza y conformación y/o el sellado inadecuado del sistema de conductos. Estos factores pueden originarse en obturaciones sin adecuada obturación apical, filtraciones en la restauración de la corona clínica, conductos no tratados, cavidades de acceso incorrectas, perforaciones, falsas vías, separación de instrumentos, entre otros⁽⁷⁾.

El sellado apico-coronal incorrecto habilita a que se infiltren en el conducto radicular, los fluidos tisulares ricos en glicoproteínas, proporcionando sustrato a los microorganismos remanentes. De esta forma pueden proliferar y alcanzar un número suficiente para generar o mantener en el tiempo, una lesión perirradicular⁽⁸⁾. Los conductos radiculares sellados pueden contaminarse desde la microbiota de la cavidad oral, como por ejemplo con filtraciones a través de materiales de restauración provisionarios o definitivos, fractura o pérdida de la restauración, lesiones cariosas que

exponen el material de obturación radicular, bolsa periodontal, o cuando transcurre un periodo prolongado desde que se obtura la endodoncia hasta que se restaura la pieza de manera definitiva. En estas circunstancias, si la obturación radicular no impide el filtrado de fluidos, los microorganismos pueden invadir y re infectar el sistema de conductos. Por lo tanto, cuando se produce una exposición coronal de la obturación radicular durante un período de 30 días o más, sería recomendable realizar la revisión del tratamiento endodóntico. Además, dado que los cementos provisionales son solubles en agua y tienen una baja resistencia a la compresión, la restauración coronaria provisional debería ser sustituida por la definitiva lo antes posible⁽⁹⁾.

Los microorganismos alojados en el conducto radicular pueden encontrarse como células planctónicas, suspendidas en la fase líquida del conducto radicular, y en forma de agregados o congregaciones adheridas a las paredes del conducto radicular, dando lugar a la formación de varias capas de biopelículas. Las biopelículas son un modelo de crecimiento bacteriano en el que las células sésiles interactúan para formar comunidades dinámicas unidas a un sustrato sólido y situadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares. Los microorganismos que viven en una misma comunidad deben tener características similares; entre ellas se encuentra la autopoiesis (tener la capacidad de autoorganizarse), homeostasis (resistir las alteraciones del medio en el que viven), sinergismo (ser más eficaces en grupo que aislados) y capacidad de responder a los cambios como una unidad y no como individuos⁽¹⁰⁾.

Para sobrevivir en un conducto que se encuentra sellado, los microorganismos tienen que resistir los antisépticos intra conducto empleados durante la limpieza y conformación, así como las diferentes medicaciones tópicas, además de adaptarse a un entorno con baja disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, sólo las pocas especies que tienen estas capacidades pueden estar implicadas en el fracaso del tratamiento endodóntico. Además, las bacterias localizadas en zonas como deltas apicales, istmos, conductos laterales, irregularidades y túbulos dentinarios, frecuentemente pueden escapar a los procedimientos de antisepsia endodóntica y es probable que el suministro de nutrientes a las bacterias permanezca inalterado después del tratamiento. Por lo tanto, las bacterias no podrán sobrevivir si el sustrato se reduce drásticamente o si el relleno radicular no permite a las bacterias acceder a los tejidos perirradiculares. No obstante, las especies de bacterias resistentes sobrevivirán durante periodos relativamente largos obteniendo nutrientes de los restos de tejido y de las células muertas. No siempre los microorganismos que consiguen sobrevivir en estas condiciones son capaces de provocar un fracaso endodóntico. De hecho, esto

sólo ocurrirá si las bacterias (sus toxinas y especialmente sus endotoxinas) son patógenas, alcanzan un número suficiente y acceden a los tejidos perirradiculares para inducir o perpetuar las lesiones perirradiculares ⁽⁸⁾.

El género *Enterococcus* enmarca un conjunto de especies morfológicamente parecidas a los *estreptococos*. Los más frecuentes que se han aislados en clínica endodóntica son el *Enterococcus faecalis* (80-90%) y *Enterococcus faecium* (5-10%). Incluyen factores microbianos, que conllevan a infecciones extrarradiculares o intrarradiculares ⁽¹¹⁾.

Otros estudios también han demostrado que el género *Enterococcus* es el más frecuente en infecciones secundarias o persistentes. Pinheiro et al., en 2003, destacaron que *E. faecalis* es, estadísticamente, el microorganismo más encontrado de mayor prevalencia (45,8%) en conductos radiculares previamente obturados, seguido de *Fusobacterium*, (6,7%) y *Propionibacterium* (3,3%). Resultados similares fueron comunicados por Siquiera y Roças y Sedgley et al., utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Observaron, respectivamente, una prevalencia de *E. faecalis* del 77% y del 79,5%. Estos autores también observaron que la presencia de *E. faecalis* es más frecuente en las infecciones secundarias (89,6%) que en las primarias (67,5%), con diferencias estadísticamente significativas ⁽¹²⁾.

Enterococcus faecalis

El *Enterococcus faecalis* en condiciones planctónicas puede resistir a diferentes antimicrobianos, también tiene la característica de poder adaptarse en medios alcalinos o ácidos, a diferentes temperaturas y puede permanecer por largos periodos con falta de nutrientes. Los factores de virulencia se pueden ver aumentados cuando se encuentra en el *biofilm* endodóntico. Dentro de los canales radiculares el *E. faecalis* puede unirse al colágeno de la dentina mediante adhesinas específicas, pudiendo así mejorar su penetración dentro de los túbulos dentinarios. En ese *biofilm* en el que se encuentran van teniendo cambios fenotípicos por diferentes factores intraconducto, que favorecen la no eliminación del microorganismo y son los que quedan pos endodoncia, muchas veces llevando al fracaso el tratamiento ^{(13) (14)}.

Mecanismos de resistencia de *E. faecalis*

E. faecalis es un coco anaerobio, grampositivo y facultativo que causa infecciones oportunistas. Posee muchos mecanismos de supervivencia para vivir en condiciones desfavorables, como crecer

en un entorno con poco oxígeno, a pH elevado, en un amplio rango de temperaturas entre 10° y 60° C, a alta salinidad o en un entorno pobre en nutrientes⁽¹⁰⁾.

Se han realizado muchos estudios para conocer los mecanismos que permiten a este patógeno resistir las medidas de desinfección durante el tratamiento endodóntico. Narayanan y Vaishnavi discutieron los mecanismos de resistencia de *E. faecalis* para vivir en presencia de medicación intracanal, como soluciones de hipoclorito de sodio y hacer que pueda escapar a esas medidas de desinfección. *E. faecalis* puede utilizar el líquido del ligamento periodontal como alimento y formar biopelículas como protección frente a la resistencia del huésped y los agentes desinfectantes. A estos mecanismos hay que añadir la capacidad de *E. faecalis* de desarrollar resistencia a los antibióticos, especialmente a la eritromicina y la azitromicina y de penetrar en los túbulos dentinarios y adherirse al colágeno⁽¹⁵⁾.

El factor principal implicado en la resistencia microbiana es la síntesis de proteínas como la proteína de superficie extracelular (SPE), proteínas de unión al colágeno (Ace), las que ayudan a unirse a la dentina e invadir túbulos dentinarios; cuando el huésped responde al mecanismo, éstas son capaces de suprimir la respuesta de los linfocitos, el que puede llevar al fracaso de la endodoncia. También producen enzimas que modifican los amino glucósidos enterococócicos. Estas proteínas juegan un rol muy importante a nivel de la pared celular bacteriana, que junto con los ácidos lipoteicoicos actúan como reguladores de la actividad autolítica de las enzimas muramidasa (peptidoglucano, encargado de proteger a la bacteria de una ruptura osmótica en ambientes acuáticos, da forma a la bacteria), participando así en la renovación de la pared celular; tiene propiedades antigénicas y es capaz de estimular la respuesta inmune. Otro factor importante es la sustancia de agregación, que, junto con la citolisina, aumentan la virulencia bacteriana, activan el modo de *quorum sensing*, provocando daño tisular en invasión profunda bacteriana al huésped. También otro factor de resistencia es el mecanismo de la bomba de protones, el que tiene la capacidad de producir protones al interior de la célula bacteriana, de esta forma logra acidificar el citoplasma bacteriano, y así adquirir la capacidad de poder sobrevivir en ambientes extremos con pH muy alcalinos por periodos de tiempo prolongados. Por otro lado, la producción de enzimas líticas como la gelatinasa (gelE), que proporciona nutrientes peptídicos a la bacteria, degradando el tejido del huésped, e interviene de alguna manera en la formación de biofilm y la hemolisina, que coadyuva en la lisis de células eritrocitarias, polimorfo nucleares, macrófagos, logrando así la disminución de la fagocitosis bacteriana, confiere propiedades β- Hemolíticas y tiene efecto bactericida contra otras bacterias.

Por último, el superóxido extracelular producido por los ácidos lipoteicoicos con la función de modular la reacción inflamatoria ⁽¹⁶⁾.

En suma, son varios mecanismos que tienen los *Enterococcus faecalis* para sobrevivir y resistir a los tratamientos químicos y mecánicos.

Características de *E. faecalis*

El *E. faecalis* puede generar una infección extrarradicular secretando toxinas directamente o a través de la inducción de la inflamación indirectamente. Además, puede producir y transferir elementos extracromosómicos y codificar rasgos de virulencia, que ayudan a colonizar y competir con otras bacterias, resistir los mecanismos de defensa del huésped y producir cambios patológicos. Además, *E. faecalis* puede formar una biopelícula bien organizada que puede resistir el proceso de reparación. Incluso puede inducir la precipitación de hidroxapatita en una biopelícula madura para formar una biopelícula calcificada ⁽¹⁷⁾.

En el año 2006 Stuart et al, llevaron a cabo un estudio donde añadieron a las características de *E. faecalis*, la capacidad de este microorganismo para utilizar el fluido dentinario y el exudado del ligamento periodontal como fuente de nutrición. Como resultado, este nutriente asegura la supervivencia de *E. faecalis* y permite a la bacteria adherirse e invadir los túbulos dentinarios ⁽¹⁸⁾.

Los factores de virulencia más importantes son la sustancia de agregación, las adhesinas de superficie bacterianas, el ácido lipoteicoico, la producción de superóxido extracelular y la liberación de dos importantes enzimas líticas: la gelatinasa y la hialuronidasa. Las sustancias de agregación son sustancias adhesivas codificadas por el plásmido, que favorecen el intercambio del plásmido entre la bacteria donante y la receptora durante el proceso de conjugación entre las bacterias. También favorecen la unión entre *E. faecalis* y diversas células eucariotas, refuerzan la adhesión de las bacterias a los colágenos de tipo I y IV y actúan como factor protector frente a los neutrófilos del huésped. La posesión de estas sustancias de agregación hace que microorganismos como *E. faecalis* estén suficientemente cualificados para estimular la liberación de α factores de necrosis tumoral (TNF- α) por los macrófagos y la liberación de γ interferón (INF- γ) y β factores de necrosis tumoral (TNF- β) como resultado de la proliferación de células T inducida por las bacterias. Como consecuencia, la liberación de TNF conducirá a la resorción ósea, mientras que la liberación de INF- γ estimulará la secreción de más peróxido de hidrógeno y aniones superóxido, lo que provocará daños en las células y los tejidos. Por otro lado, las adhesinas de superficie aumentan la virulencia

de *E. faecalis* al adherir la bacteria a muchas sustancias esenciales, como superficies abióticas (para formar biopelículas), otras especies de bacterias (para intercambiar genes y nutrientes), fibras de colágeno, suero humano y tejidos dentinarios ⁽¹⁹⁾.

Los genes de supervivencia express del *E. faecalis*

Ran et al. en 2015 explicaron la regulación génica responsable del proceso de adaptación de estas bacterias a condiciones de estrés alcalino. En pH 10, *E. faecalis* expresa 613 genes, estos se expresaban de forma diferencial; se encontró que 211 genes estaban regulados al alza de forma diferencial y 402 genes regulados a la baja de forma diferencial. La mayoría de los genes sobrerregulados estaban relacionados principalmente con genes que codifican el transporte y metabolismo de aminoácidos y nucleótidos, lo que significa que *E. faecalis* es capaz de utilizar algunos aminoácidos como fuentes de carbono y energía, en condiciones de alta alcalinidad, para favorecer la biosíntesis de pirimidina, lo que se traduce en un aumento de la virulencia bacteriana. Por otro lado, los genes regulados a la baja son genes implicados en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos ⁽²⁰⁾.

La vía glucolítica de *E. faecalis* se ve afectada durante el crecimiento en condiciones alcalinas, lo que lleva a las células bacterianas a utilizar vías metabólicas alternativas para utilizar fuentes de energía menos preferidas, como la fructosa y la manosa. Además del mecanismo anterior de regulación génica, *E. faecalis* tiende a sintetizar proteínas inducidas por el estrés para sobrevivir en condiciones de estrés ambiental. La bomba de protones tiene un papel importante en la regulación del pH dentro de la célula bacteriana para sobrevivir. Cuando el pH se vuelve muy alcalino debido a la aplicación de hidróxido de calcio intra conducto, esto activará la bomba de protones y, como consecuencia, el transporte de protones al interior de la célula para disminuir la alcalinidad del citoplasma. Sin embargo, esta bomba funcionará bien hasta que se sature a un pH de 11,5. Entonces, la bomba dejará de funcionar, lo que provocará la muerte celular ⁽²¹⁾.

El control de la infección intrarradicular

A medida que la defensa del hospedero (y también considerando su estado inmunitario) disminuyen las resistencia para el acceso al espacio pulpar necrótico, los microorganismos oportunistas, beneficiados por el bajo tenor de oxígeno, invaden, progresan y se acumulan en el sistema de conductos radiculares. Estas comunidades microbianas pueden sobrevivir gracias a los restos

orgánicos pulpaes remanentes y por el exudado del periodonto. En consecuencia, los grupos de microorganismos en dientes necróticos y dientes endodónticamente tratados de manera fallida, se distribuyen en toda la luz del conducto, encontrándose en la zona apical los que tienen acceso al líquido tisular ⁽²²⁾.

Las infecciones primarias del conducto radicular son polimicrobianas y suelen estar dominadas por bacterias anaerobias obligadas. Los microorganismos aislados con mayor frecuencia antes del tratamiento del conducto radicular son los bacilos anaerobios gramnegativos, los cocos anaerobios grampositivos, las bacterias anaerobias grampositivas y las bacterias facultativas ⁽²²⁾.

Los anaerobios obligados se erradican con más fácilmente durante el tratamiento del conducto radicular. En cambio, las bacterias facultativas como los *Streptococos* no mutans, los *Enterococos* y los *Lactobacilos*, una vez establecidas, tienen más probabilidades de sobrevivir a la instrumentación quimiomecánica y a la medicación del conducto radicular. En particular *Enterococcus faecalis* ha sido objeto de atención en la literatura endodóntica, ya que con frecuencia se aísla de los conductos radiculares en casos de fracasos endodónticos, como ya se ha mencionado en este trabajo ⁽²²⁾.

Además, también pueden encontrarse levaduras en conductos radiculares asociados a periodontitis apical resistente al tratamiento. Es probable que la mayoría de los microorganismos capaces de colonizar el sistema de conductos radiculares necróticos causen lesiones inflamatorias periapicales ⁽²²⁾.

El control de la infección intrarradicular en endodoncia se logra mediante la combinación de métodos mecánicos y químicos. Con respecto a los métodos químicos, los irrigantes penetran en los canalículos dentinarios y son fundamentales para poder reducir la carga microbiana, entre otras aplicaciones.⁽²³⁾ Sin embargo, en cuanto a los métodos mecánicos, durante la conformación un porcentaje significativo de la superficie del conducto radicular permanece intacto, independientemente de los instrumentos utilizados para la conformación. Tales áreas no alcanzadas pueden albergar y proteger a los microorganismos de los protocolos de desinfección del conducto radicular ⁽¹³⁾.

Hipoclorito de sodio

El cloro es uno de los elementos más ampliamente distribuidos en la Tierra. No se encuentra en estado libre en la naturaleza, sino en combinación con sodio, potasio, calcio y magnesio.

El hipoclorito potásico fue la primera solución acuosa de cloro producida químicamente, inventada en Francia por Berthollet (1748-1822). A finales del siglo XVIII, Percy fabricó esta solución industrialmente en Javel, cerca de París, de ahí el nombre de "Agua de Javel". En un principio, las soluciones de hipoclorito se utilizaban como agentes blanqueadores. Posteriormente, el hipoclorito de sodio fue recomendado por Labarraque (1777-1850) para prevenir la fiebre del parto y otras enfermedades infecciosas. Basándose en los estudios de laboratorio controlados de Koch y Pasteur, el hipoclorito como desinfectante fue ganando aceptación a finales del siglo XIX ⁽²²⁾.

En la Primera Guerra Mundial, el químico Henry Drysdale Dakin y el cirujano Alexis Carrel extendieron el uso de una solución tamponada de hipoclorito sódico al 0,5% a la irrigación de heridas infectadas.

Dentro de sus beneficios se destaca que las soluciones de hipoclorito sódico son de muy bajo costo, fáciles de conseguir y tienen una buena vida útil teniendo en cuenta las especificaciones establecidas por los fabricantes ⁽²²⁾.

En agua, el hipoclorito de sodio se ioniza en sodio (Na) e ion hipoclorito (ClO^-). Entre valores de pH 4 y 7, el ion cloro existe como ácido hipocloroso (HClO) mientras que, a pH superiores a 9, predomina el ClO^- . El HClO tiene una fuerte acción antibacteriana en comparación con el ClO^- debido a su capacidad de interrumpir la fosforilación oxidativa y otras actividades asociadas a la membrana. El HClO también ejerce un rápido efecto inhibitorio sobre la función mitocondrial y la síntesis de ADN de las bacterias. Además de su acción antibacteriana, el hipoclorito sódico tiene la capacidad de disolver los restos pulpares y el componente orgánico de la dentina (es decir, acción proteolítica inespecífica). También tiene la capacidad de neutralizar parcialmente los tejidos necróticos o cualquier componente antigénico o microbiano que quede en el espacio del conducto radicular y eliminar todos los restos pulpares y la pre dentina en las superficies no instrumentadas ^{(24) (25)}.

El irrigante que se utiliza generalmente es la solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), por sus propiedades organolítica, desodorante, blanqueante y microbicida ⁽²⁶⁾. Sin embargo, varios estudios han demostrado que no se logra la eliminación total de los microorganismos, de manera consistente

con los protocolos actuales. El hipoclorito de sodio tiene acciones citotóxicas, siendo éste otro motivo en la búsqueda de nuevos irrigantes ⁽²⁷⁾.

En nuestro medio es aceptado el uso del hipoclorito de sodio en concentración del 2.5% como irrigante de los conductos radiculares ⁽¹³⁾.

Agua superoxidizada

Otro de los irrigantes empleados es el agua superoxidizada. Se ha demostrado que ésta brinda una limpieza eficaz de las paredes del conducto radicular ⁽²⁷⁾.

La solución de agua superoxidizada (SASO) es una solución de ácido hipocloroso con una concentración de cloro libre de 250 mg/l a la salida de fábrica 250 partes por millón y un pH de 6 (+- 1). Además de este componente existen otros compuestos reactantes de cloro (ozono, hipoclorito de sodio, cloro, etc. <0,02%). El agua super oxidizada se obtiene electroalizando cloruro de sodio con aguas puras, para crear un desinfectante o antiséptico con dos materiales básicos que son la sal y la electricidad, dando un producto final (agua) que no daña el medio ambiente. Los principales productos de estas aguas son el ácido hipocloroso y el cloro a una concentración variable de acuerdo al fabricante: entre 144 a 350 mg/l. El antiséptico es generado en el lugar de uso pasando la solución salina sobre electrodos de titanio de 9 amps. El pH de esta agua se encuentra entre 5 y 6.5 y tiene un potencial redox mayor de 950 mV. Estas soluciones han demostrado no ser tóxicas para los tejidos, ni corrosivos para los equipamientos ^{(28) (29)}.

En nuestro país se comercializa sólo una marca registrada en el Ministerio de Salud Pública que es el Xtericold [®], una solución pronta para su uso. Ésta será la que se utilizará en este estudio.

Terapia fotodinámica (PDT)

Se ha intentado innovar en técnicas de control de infecciones polimicrobianas, para mejorar el saneado y reducir aún más los microorganismos a nivel del conducto radicular; utilizando métodos alternativos que combinan agentes irrigantes con procedimientos de la biofotónica, como la terapia fotodinámica (PDT)⁽³⁰⁾.

La terapia fotodinámica es un tratamiento que se realiza en dos etapas, que implican la aplicación y la retención de una sustancia fotosensibilizadora (PS) en los tejidos/microorganismos diana. Dependiendo de la especie microbiana predominante y la existencia de competidores (exudado, hemorragia, etc) se determina un tiempo de espera, llamado tiempo de preirradiación ⁽³¹⁾.

Transcurrido este periodo, se remueve el exceso de PS y se aplica una fuente de luz cuya longitud de onda sea resonante con el PS empleado. La técnica más ampliamente estudiada utiliza como fotosensibilizador un colorante fenotiazínico, por ejemplo, el azul de metileno, y una luz visible en una longitud de onda roja. La misma puede aplicarse a través de un equipo de láser con una longitud de onda de 660-680 nm, que permite dirigir el haz de luz directamente al objetivo (interior de sistema de conductos hasta la zona apical, tracto fistuloso, etc)⁽³²⁾.

Tras la irradiación, las moléculas del azul de metileno adquieren los electrones transmitidos, permaneciendo en una órbita excitada o sea en un nivel energético superior. Las reacciones fotoquímicas que se desencadenan estimulan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Éstas son diversas, siendo el oxígeno singlete una de las más abundantes y metaestables. Las ROS son altamente citotóxicas por su carácter oxidativo, interactuando con las biomoléculas de la membrana microbiana o del ADN, provocando la muerte celular programada⁽³²⁾.

La actividad antimicrobiana de la técnica PDT es eficaz frente a bacterias, virus y hongos, no es irritante y no genera resistencia bacteriana⁽³³⁾.

Hipótesis

La solución de agua superoxidizada y la terapia fotodinámica tienen propiedades antimicrobianas que justifican su uso en la antisepsia del sistema de conductos, con la misma eficacia que la solución de hipoclorito de sodio.

Objetivos

General

Comparar la respuesta del *Enterococcus faecalis* a tres estrategias antimicrobianas.

Específicos

Evaluar *in vitro* la respuesta del *Enterococcus faecalis* frente a la solución de hipoclorito de sodio.

Evaluar *in vitro* la respuesta del *Enterococcus faecalis* frente al agua superoxidizada.

Evaluar *in vitro* la respuesta del *Enterococcus faecalis* frente a la terapia fotodinámica.

Metodología

El proyecto fue enviado para su evaluación a la Unidad de Investigación de la Facultad de Odontología (UIFO) y por su intermedio al Comité de Ética de la Facultad de Odontología. El mismo fue aprobado el 14 de diciembre del año 2023 (Anexo 1).

Selección y preparación de los dientes

Para este estudio se seleccionaron premolares humanos permanentes con raíces completamente formadas del acervo de la Cátedra de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República. Estas piezas estaban libres de calcificaciones, reabsorciones dentinarias internas y externas, manipulaciones endodónticas previas o fracturas radiculares. Se conservaron en un medio líquido compuesto por 50% de agua y 50% de glicerina, para mantenerlos hidratados.

La unidad de muestreo fue el conducto principal de premolares inferiores humanos permanentes, con raíces completamente formadas, totalizando 100 conductos radiculares evaluados.

Los premolares se radiografiaron en dirección ortorradial empleando un radiovisiógrafo Carestream 5200 (Carestream Dental LLC, Atlanta, USA) y un equipo de Rx odontológico intraoral Carestream (Carestream Dental LLC, Atlanta, USA), a 70kV y 10 mA, con tiempo de exposición de 0,2 segundos y distancia foco/sensor de 15cm. Las imágenes se almacenaron en formato JPEG.

La muestra se realizó aleatoria y estratificada en base al ángulo de curvatura, radio y longitud del conducto radicular.

Ángulo y radio de curvatura

El ángulo y el radio de curvatura de los conductos brindan la descripción más exacta de las curvaturas así como la complejidad de su abordaje. Para determinar el ángulo de curvatura se utilizó el método de Schneider (1971)⁽³⁴⁾. En el programa Adobe Photoshop (v. 6.0, Adobe Systems, San Jose, CA, USA.) se trazaron dos líneas sobre cada una de las imágenes escaneadas. Se trazó una línea en la pared mesial del conducto radicular, paralela a su eje longitudinal. Luego, se trazó otra línea desde el vértice radiográfico (punto B) hasta la intersección con la primera línea trazada en el punto donde comienza la curvatura, es decir, cuando la pared mesial comienza a dejar dibujado el eje mayor (punto A). Se registró el ángulo agudo formado por estas dos líneas. Se utilizó la clasificación

de Seidberg, et al.⁽³⁵⁾ donde se clasifica los ángulos como bajo ($<5^\circ$), moderado ($5-25^\circ$) y severo ($\geq 26^\circ$).

Después de definir la curvatura de los conductos radiculares a través de mediciones de ángulos, se calculó su radio utilizando la fórmula propuesta por Schäfer et al.(2002)⁽³⁶⁾ que, con base en los principios geométricos de un triángulo isósceles, determina el radio (r) como la distancia A-B (distancia desde el foramen apical hasta el inicio de la curvatura en mm) sobre 2 veces el seno del ángulo encontrado en cada conducto radicular. El radio de curvatura es inversamente proporcional al ángulo, o sea un radio pequeño se corresponderá con ángulos de curvatura severos. Según Estrela et al. (2008)⁽³⁷⁾ el radio de curvatura se puede clasificar en 3 categorías: pequeño (≤ 4 mm), intermedio ($>4 - \leq 8$ mm) y el gran radio (> 8 mm).

El criterio de inclusión fue: premolares inferiores con longitudes de conducto radicular entre 10 y 15 mm, ángulo de curvatura hasta 25° y radios de curvatura entre 5 y 8 mm.

Limpieza y Conformación

Cada conducto se irrigó con 2 mL de solución de hipoclorito de sodio al 2,5% (Lab. Leduc, Montevideo, Uruguay) utilizando jeringas de plástico desechables de 5 mL (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT, EE. UU.) y agujas NaviTip (Ultradent Products Inc, South Jordania, UT, EE. UU.). Se utilizaron cánulas de aspiración asociadas a una bomba de succión para aspirar la solución durante la irrigación. La irrigación con 2 mL de la solución se realizó antes de explorar el conducto, en cada cambio de instrumento y cada vez que se retiró el instrumento del canal.

La longitud del canal se estableció cuando la punta del instrumento se hizo visible en la salida foraminal. Para ello, se utilizó una lupa de cuatro aumentos, momento en el que se retiró la lima del canal y se midió con regla de endodoncia (Angelus Ltda. – Londrina, Paraná, Brasil).

Se realizó la exploración con instrumentos de acero inoxidable precurvado tipo K número 10 (Antaeos, VDW GmbH, Munich, Alemania) hasta la longitud de trabajo en cada conducto radicular.

Todas las piezas se conformaron con limas Reciproc[®] 25 (VDW GmbH, Munich, Alemania). La activación mecánica de los instrumentos se realizó con el contra-ángulo reductor 6:1 Sirona (VDW GmbH, Munich, Alemania) acoplado al micromotor SM 16845 (VDW GmbH, Munich, Alemania) conectado al motor eléctrico VDW Silver con actualización Reciproc[®] (VDW GmbH, Munich,

Alemania). La velocidad de rotación y el torque del motor se calibró utilizando la función de calibración (CAL), predefinida para cada sistema.

A continuación, se colocaron dos capas de esmalte de uñas en la superficie externa para evitar la microfiltración bacteriana a través de los canales laterales u otras discontinuidades del cemento. Para finalizar el proceso de preparación se esterilizaron todos los dientes en un ciclo de autoclave (Cristófoli Vitale, Brasil).

Contaminación con *Enterococcus faecalis*

Se enumeraron los dientes dividiéndolos en 4 grupos de 25 cada uno, mediante una técnica de muestreo aleatorio simple y luego se contaminaron.

El estudio se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Kuştarci et al. (2009) ⁽³⁸⁾.

La fase laboratorial se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología, Udelar.

Se empleó un cultivo de *E. faecalis* del banco de cepas de la Cátedra de Microbiología, el que fue recuperado en medios de cultivo. La cepa se encontraba congelada. Se descongeló y se sembró en un medio simple como el TSA (triptosa soya agar) y en un medio rico de Agar Sangre. Luego se incubó en atmosfera enriquecida en CO₂, 48 horas en estufa a 37 grados Celsius.

Se obtuvo un crecimiento en los dos medios y se observó un cultivo puro y colonias aisladas, las que se identificaron con métodos fenotípicos tradicionales. Estos esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana, se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas.

Con respecto a la caracterización fenotípica, podemos afirmar la morfología microscópica (tinción de Gram) que corresponde con cocos Gram positivos agrupados en cadenas cortas o en diplos, de forma cocobacilar.

En cuanto a la morfología macroscópica se observaron colonias no hemolíticas en el agar sangre (gama hemolítica), de tamaño pequeño (0,5–1 mm) opacas y blancas.

A la prueba de la catalasa dio negativa, sin embargo el crecimiento en caldo salado con 6,5% de NaCl fue positivo. También el crecimiento en presencia de bilis con reducción de esculina es positivo y frente a la hidrólisis del PYR son positivos, lo que corresponde con el género *Enterococcus sp.*

La identificación a nivel de especie se confirma por metodología proteómica. La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Se utilizó la técnica de espectrometría de masas llamada MALDI -TOF, desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) y TOF por el analizador time of flight (tiempo de vuelo); obteniendo un score de 95% correspondiente a *Enterococcus faecalis*.

Por lo que se aseguró su identificación a través de técnicas bioquímicas y por MALDI-TOF, realizado por el Departamento de Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas. (Anexo 2)

Se utilizó un cultivo puro de *E. faecalis*, cultivado en el caldo de infusión, cerebro corazón (BHI) para contaminar los conductos radiculares. Se utilizó el número estándar 0.5 de McFarland para evaluar el caldo y garantizar que el número de bacterias sea de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) mL⁻¹.

Se transfirió una cantidad de 10- μ l del cultivo bacteriano a la luz de los conductos conformados, con una micro pipeta estéril. Inmediatamente se almacenaron por 24 horas a 37 grados Celsius.

Grupos experimentales

Grupo 1. Hipoclorito de sodio 2.5%. Inicialmente los conductos se irrigaron con 1 ml de solución salina estéril (Lab. ICU-VITA, Montevideo, Uruguay). Luego los conductos radiculares se irrigaron con 2 ml de solución de NaOCl al 2,5% (Lab. Leduc, Montevideo, Uruguay). Los irrigantes se llevaron a los conductos mediante una jeringa de plástico desechables de 5 mL (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT, EE. UU.) y aguja NaviTip (Ultradent Products Inc, South Jordania, UT, EE. UU.) La presión aplicada por el operador sobre la jeringa fue la necesaria y suficiente para permitir un flujo de 2 ml de irrigante por minuto. La solución se dejó en los conductos radiculares durante 10 minutos.

Grupo 2. Agua superoxidizada. Inicialmente los conductos se irrigaron con 1 ml de solución salina estéril (Lab. ICU-VITA, Montevideo, Uruguay). Luego los conductos radiculares se irrigaron con 2 ml de solución de agua superoxidizada, Xtericold®(laboratorio EMARLAND S.A.). Utilizando el mismo procedimiento que en el grupo anterior.

Grupo 3. Terapia Fotodinámica. Inicialmente los conductos se irrigaron con 1 ml de solución salina estéril (Lab. ICU-VITA, Montevideo, Uruguay). Como fotosensibilizador se utilizó 2 ml de azul de metileno al 0.01% (Chimiolux 10 DMC, Brasil), el cual fue irrigado hasta la zona apical con aguja NaviTip (Ultradent Products Inc, South Jordania, UT, EE. UU.). El tiempo de preirradiación se estableció en 3 minutos. Se secaron los conductos con cono de papel Reciproc[®] 25 (VDW GmbH, Munich, Alemania). Los conductos radiculares se irradiaron con un equipo Therapy (DMC, Brasil) de 100mW, longitud de onda de 660nm, y una energía de 9 Joules (J). Al equipo se le insertó una guía de luz para PDT (DMC, Brasil) cuya fibra tiene un diámetro de 200 µm. La fibra se aplicó con un movimiento en espiral que comenzó a 1 mm del ápice y se desplazó en sentido coronario durante 90 segundos.

Grupo 4. Grupo control. Se irrigó con 2 ml de solución salina estéril (Lab. ICU-VITA, Montevideo, Uruguay). Se llevó a los conductos mediante una jeringa de plástico desechables de 5 mL (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT, EE. UU.) y aguja NaviTip (Ultradent Products Inc, South Jordania, UT, EE. UU.)

Evaluación bacteriana

La evaluación bacteriana se realizó en dos momentos. El primero se ejecutó luego de pasado el tiempo de incubación. Se colocó un cono de papel estéril Reciproc[®] 25 (VDW GmbH, Munich, Alemania) y se mantuvo 1 minuto en el interior de cada conducto para muestrear las bacterias de los conductos radiculares con el fin de confirmar la contaminación. Los conos de papel se transfirieron a tubos eppendorf (Biologix[®], Biriden, Montevideo, Uruguay) autoclavados, conteniendo 2 mL de caldo BHI.

Los tubos se agitaron durante 2 minutos y se inocularon 10 µL de suspensión en 1 parte de placas de TSA (triptosa, soya, agar) que se dividieron en 2.

Después de realizadas las intervenciones en los diferentes grupos, los conductos radiculares experimentales se irrigaron con 1 ml de solución salina estéril. A continuación, se introdujeron conos de papel estéril Reciproc[®] 25 (VDW GmbH, Munich, Alemania) en los conductos radiculares durante 1 minuto y se transfirieron a tubos eppendorf que tenían 2 ml de caldo BHI. Los tubos se agitaron en vórtex durante 2 minutos y se inocularon 10 µl de suspensión en la segunda parte de las placas de TSA descritas anteriormente. Se hicieron dos sembrados por cada toma, para robustecer la muestra sin modificar la cantidad de especímenes. Se obtuvieron 2 placas por cada diente, con una

mitad la siembra contaminada y la otra mitad la siembra luego de la aplicación del antiséptico. Las placas de TSA se incubaron durante 24 horas a 37°C, se contaron las colonias de bacterias y se registraron.

Análisis Estadístico

El análisis se llevó a cabo sobre 200 sembrados (2 por diente) de *Enterococcus faecalis*. Se aplicaron 4 tratamientos (hipoclorito de sodio, agua superoxidizada, PDT y suero) a 50 sembrados cada uno. A partir de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) antes y después de la irrigación con cada tratamiento se calculó la reducción porcentual. Se realizó un análisis descriptivo de los datos empleando de forma univariada (empleando la mediana el rango intercuartílico) y bivariada (a través de gráficos de caja y línea). Dada la naturaleza asimétrica de la reducción porcentual, se emplearon procedimientos no-paramétricos para comparar la efectividad de estos cuatro tratamientos (test de Kruskal-Wallis) ⁽³⁹⁾. Posteriormente se realizaron comparaciones múltiples empleando el test de Nemenyi ⁽⁴⁰⁾, indicando con letras iguales medianas que no difieren de manera significativa y con letras diferentes medianas que si difieren significativamente. Los p-valores se obtuvieron mediante permutaciones aleatorias. Todos los cálculos fueron realizados en el software R (R Core Team, 2023) ⁽⁴¹⁾. Se determinó significación estadística empleando un nivel de 5%.

Resultados

Se contó con 50 mediciones de UFC en cada uno de los 4 tratamientos. La reducción porcentual tuvo una mediana de 87,3% (cociente=0,127) con un rango intercuartílico de 43,3%. La Figura 1 presenta la distribución del cociente de las UFC antes y después de la irrigación.

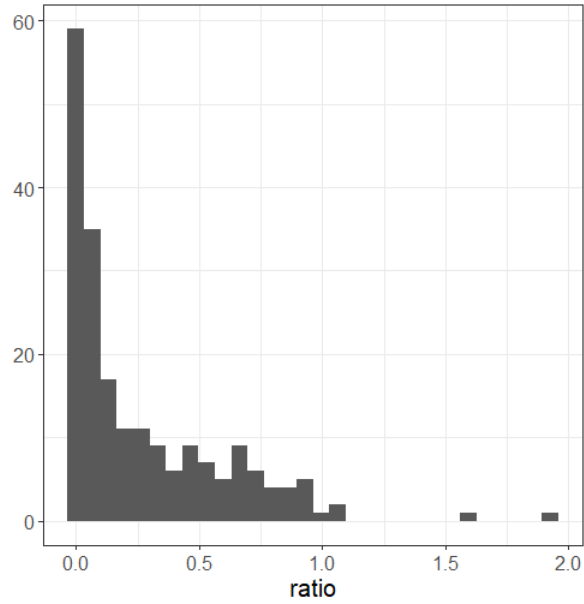


Figura 1 – Distribución del cociente de UFC antes y después de la irrigación

A partir de la Figura 2 se puede observar que el suero presenta los menores porcentajes de reducción. Por otro lado, el hipoclorito y el PDT parecen presentar reducciones similares. En última instancia, el tratamiento SASO presentó los mayores niveles de reducción.

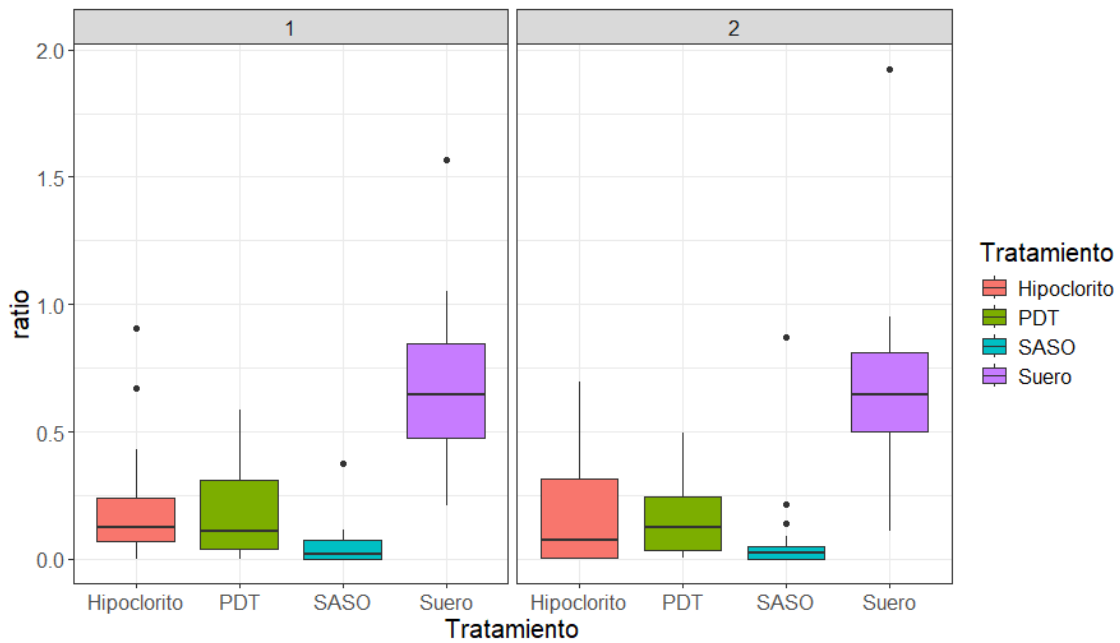


Figura 2 – Distribución del cociente entre el conteo de UFC antes y después de la irrigación según repetición.

En el cuadro 1 se presenta la reducción mediana de cada tratamiento, así como la comparación empleando el test de Kruskal-Wallis. Complementariamente, las letras que acompañan las medianas corresponden a las comparaciones múltiples realizadas a través del test de Nemenyi.

Cuadro 1 – Eficacia de los tratamientos sobre la reducción de UFC.

Tratamiento	global		1era rep	2da rep
Hipoclorito	9%	a	12%	8%
PDT	13%	a	11%	13%
SASO	2%	b	2%	2%
Suero	64%	c	65%	64%
KW	<0,001		<0,001	<0,001

Se puede observar que tanto a nivel global como separando por réplicas, se obtuvo un valor significativo del test de Kruskal-Wallis. A partir de los 6 p-valores obtenidos en las comparaciones múltiples (test de Nemenyi) se determinó que no existió evidencia significativa para diferenciar la reducción del hipoclorito de la reducción obtenida con PDT. No obstante, se observó que el suero tuvo la menor eficacia y que el SASO fue el tratamiento más eficiente.

Discusión

El *E. faecalis* se ha utilizado ampliamente como un importante marcador microbiológico para estudios in vitro porque ha sido capaz de colonizar la pared del conducto radicular en forma de biofilm y penetrar en los túbulos dentinarios. También es capaz de sobrevivir en condiciones extremas y son resistentes a la fagocitosis y a los agentes antimicrobianos ⁽⁴²⁾.

Como se ha descrito, el *Enterococo faecalis* es uno de los microorganismos que se busca erradicar durante la limpieza y conformación, ya que es uno de los principales responsables de fracaso de los tratamientos endodónticos ⁽²²⁾.

Se ha demostrado que varias concentraciones de hipoclorito sódico son eficaces contra *E. faecalis*. Siqueira et al. sugirieron que el NaOCl al 2,5% presenta una eficacia antibacteriana similar en comparación con el 5%, cuando se realizan modificaciones como el uso de volúmenes mayores o la combinación con otros irrigantes o la agitación para aumentar su eficacia ⁽⁴³⁾.

En un estudio llevado a cabo por Shahram et al., se estudió la erradicación del *E. faecalis* con varios tipos de láseres además con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5%. Las UFC de *E. faecalis* disminuyeron significativamente tras la irrigación con hipoclorito de sodio (NaOCl). El NaOCl al 2,5% (5 min) sólo mostró reducción de *E. faecalis* en el sistema de conductos radiculares de dientes humanos extraídos. Sin embargo, cuando se combinó con láser de diodo, el NaOCl al 2,5% fue más eficaz en la eliminación de *E. faecalis*. El efecto del NaOCl más la PDT fue la terapia más eficaz y consiguió la eliminación del 100% de *E. faecalis* tras un tiempo de contacto de 2 minutos ⁽⁴⁴⁾.

Hay varias variables que deben tenerse en cuenta al desarrollar un protocolo de PDT, incluidos los parámetros de luz, los fotosensibilizadores y las técnicas de administración de luz. El pico de absorción de un fotosensibilizador debe coincidir con la longitud de onda de la luz utilizada para la irradiación con el fin de promover la formación de oxígeno singlete, una molécula de oxígeno altamente reactiva responsable de la eliminación bacteriana mediada por terapia fotodinámica. Tanto el azul de metileno como el azul de toluidina son colorantes de fenotiazina que tienen una longitud de onda máxima de absorción de 656 nm y 625 nm, respectivamente. La eficacia antibacteriana de la terapia fotodinámica también puede depender de la concentración del fotosensibilizador. Para la desinfección endodóntica, se han probado fotosensibilizadores en concentraciones que oscilan entre 6,25 mg/mL y 25 mg/ mL para el azul de metileno y entre 10 mg/mL y 100 mg/ mL para el azul de toluidina. Los resultados de este estudio mostraron que la reducción del número de UFC fue estadísticamente significativa para todos los grupos: clorhexidina, NaOCl, láser más azul de metileno (PDT), láser/NaOCl y PDT/NaOCl frente a *E. faecalis*. Sin embargo, no se detectaron células viables con la combinación PDT/NaOCl⁽⁴⁵⁾.

Souza et al. informaron que la PDT con azul de metileno o azul de toluidina no tuvo un efecto adicional significativo a la preparación químico mecánica utilizando NaOCl al 2,5% como irrigante en la reducción de las poblaciones de *E. faecalis*. Se informó del efecto antibacteriano adicional del PDT con cualquiera de los fotosensibilizadores (azul de metileno y azul de toluidina), pero sólo fue estadísticamente significativo para el azul de toluidina ⁽⁴⁶⁾.

Pupo et al., concluyeron en un estudio donde se utilizó hipoclorito de sodio al 5% y al 2.5%, que la concentración del agente antimicrobiano no era responsable por la diferencia en la reducción del *Enterococcus faecalis*, como ya lo había determinado Siqueira. Habiendo mostrado una disminución significativa de las unidades formadoras de colonia ⁽¹⁴⁾.

Por otra parte, Nair et al. observaron que la terapia fotodinámica era menos eficaz para eliminar *E. faecalis* así como la capa de barrillo dentinario de los conductos radiculares curvos. La presencia de células muertas y restos celulares en la estructura de la biopelícula neutraliza la eliminación mediada por el PDT, de modo que el fotosensibilizador, el oxígeno y la luz no pueden alcanzar a las bacterias en las capas más profundas de la biopelícula. La baja eficacia antimicrobiana del PDT también se debió a la baja concentración de oxígeno disponible en los conductos, especialmente en las irregularidades y en los túbulos dentinarios. Por lo tanto, el uso conjunto de NaOCl y EDTA puede ser responsable de la eficacia de la PDT, el EDTA por las propiedades que puede tener sobre el barrillo dentinario ⁽⁴⁷⁾.

La mayoría de los estudios han utilizado conos de papel para el muestreo del conducto radicular, lo que restringe las muestras a una porción de bacterias planctónicas del líquido del conducto radicular y subestima los recuentos bacterianos ⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾. Se recomienda conformar la pared del conducto radicular para mejorar el muestreo de las bacterias organizadas en una estructura de biopelícula ⁽⁵⁰⁾. Este método permite tomar muestras de las bacterias presentes en los túbulos dentinarios. Esto explica porque en nuestro estudio experimental las bacterias al ser irrigadas tuvieron este comportamiento planctónico y también el tiempo de incubación, 24 horas no es suficiente para penetrar en los canalículos dentinarios ni mucho menos formar biofilm porque se encuentran en un diente estéril, siendo estas las únicas bacterias presentes.

En un estudio realizado por Ali Mozayeni et al, también concuerdan con los anteriores descritos que el PDT no es suficiente para eliminar los microorganismos dentro de los conductos radiculares, sino que un método coadyuvante prometedor para una mayor reducción de los microorganismos tras la preparación químio-mecánica convencional ⁽³²⁾. Se utilizaron láser de baja potencia de diodo como en nuestro trabajo experimental, que emite luz en el espectro rojo con un pico de potencia a 630 nm. Las lámparas LED son fuentes de luz alternativas más seguras, ya que no provocan un cambio significativo de temperatura. El uso de LED en PDT contra *E. faecalis* ha mostrado resultados positivos ⁽⁵¹⁾. Los resultados del estudio de Mozayeni et al. demostraron que la PDT utilizando sustancia fotosensibilizadoras redujo significativamente las UFC/mL de *E. faecalis*. La adición de PDT a la irrigación con NaOCl produjo un mayor efecto bactericida en comparación con el tratamiento endodóntico convencional. Este hallazgo concuerda con estudios anteriores. Vaziri et al evaluaron el efecto antibacteriano del NaOCl al 2,5% y la combinación de irrigación con NaOCl al 2,5% con PDT

utilizando un láser de diodo de 625 nm contra *E. faecalis* e informaron de una eficacia bactericida superior de la combinación sobre el uso exclusivo de NaOCl ^{(51) (44)}.

Como ya fue descrito el *E. faecalis*, es coco Gram positivo, que tiene una membrana relativamente porosa, construida sobre una gruesa capa de peptidoglicano y ácido lipoteicoico. Esta morfología celular favorece una mayor difusión del fotosensibilizante en el interior de la bacteria. Las bacterias Gram negativas tienen un elemento estructural adicional de 10-15 nm de grosor, que es externo a la red de peptidoglicano e inhibe la penetración de muchas sustancias⁽⁵²⁾. Se descubrió que los fotosensibilizadores cargados positivamente a valores de pH fisiológicos, como el azul de toluidina o azul de metileno, tienen potencial para fotoinactivar tanto las células bacterianas Gram-positivas como las Gram-negativas⁽⁵³⁾.

Pražmo et al. confirman que la terapia fotodinámica es eficaz en la reducción de la biopelícula bacteriana de *E. faecalis*. Las condiciones experimentales in vitro no permitieron la eliminación completa del factor infeccioso. Sin embargo, el método UFC/ml, utilizado en el estudio para determinar el número de colonias bacterianas restantes, tiene sus restricciones. No mide las colonias de *E. faecalis* que penetran profundamente en los túbulos dentinarios. Es imposible determinar cuantitativamente el número de bacterias que permanecen en las capas más profundas de la dentina tras la aplicación de diferentes métodos de desinfección. En un entorno aeróbico rico en nutrientes, *E. faecalis* penetra en los túbulos dentinarios hasta una profundidad media de 1483,33 μm .⁽⁵⁴⁾ En condiciones anaeróbicas, la profundidad de penetración disminuye a 1166,66 μm , y la menor profundidad medida de colonización de los túbulos es de 620 μm en un entorno anaeróbico privado además de nutrientes⁽⁵⁴⁾. La capacidad de penetración de los túbulos dentinarios de NaOCl es significativamente menor. Sin embargo Berutti et al. observaron que la profundidad era de 130 μm tras la eliminación de la capa de barrillo dentinario de la superficie de la dentina⁽⁵⁵⁾. Por lo tanto, la ausencia de células bacterianas en el material recogido tras la irrigación experimental con NaOCl no indica una eliminación completa del factor infeccioso a lo largo de los túbulos dentinarios. La terapia fotodinámica es un protocolo de tratamiento en odontología que está teniendo cada vez más relevancia. Bumb et al. evaluaron la profundidad de los túbulos dentinarios a la que la PDT es eficaz para eliminar *E. faecalis* ⁽⁵⁶⁾. Las imágenes de microscopio electrónico de barrido confirmaron la ausencia de infección a una profundidad de 890-900 μm . Estos valores indican que la terapia fotodinámica muestra una eficacia significativamente mayor en la eliminación de *E. faecalis* de la profundidad de los túbulos dentinarios que el NaOCl utilizado

convencionalmente.

La irrigación con NaOCl presentó las mejores propiedades antibacterianas en el estudio descrito. Durante la irrigación, el flujo de líquido provoca la evacuación de las células bacterianas dañadas de los conductos radiculares y aumenta la penetración en los túbulos dentinarios. La aplicación de fotosensibilizador con vibración ultrasónica adicional antes de la aplicación de luz también podría ser una buena modificación para mejorar los resultados de la terapia fotodinámica. Las ondas ultrasónicas tienen potencial para mejorar la penetración de la sustancia fotoactivada en la estructura de la biopelícula, ya que mejora la eficacia de la irrigación ⁽³⁰⁾⁽⁵⁷⁾.

La seguridad del método de desinfección también es una cuestión importante. Una concentración elevada de NaOCl es citotóxica para los tejidos que rodean la región apical de un diente. George et al. demostraron que la citotoxicidad de la PTD es significativamente menor que la del NaOCl al 5,25%. Su estudio indicó que la desinfección inducida por luz produce un efecto insignificante en las células de mamíferos ⁽⁵⁸⁾. Xu et al. reportan que, los parámetros fotodinámicos, similares a los que pueden aplicarse en la desinfección endodóntica, tienen efectos modestos sobre los osteoblastos y los fibroblastos gingivales, mientras que el hipoclorito sódico elimina por completo estas células ⁽⁵⁹⁾.

Los estudios que se han descrito anteriormente, llegan a la conclusión que hay diferencias en las UFC cuando se utiliza el hipoclorito de sodio o se hace terapia fotodinámica con un láser de baja potencia con una sustancia fotosensibilizadora como el azul de metileno y aplicación en rojo, pero lo que da mejor resultado es cuando se usan las terapias combinadas.

Con respecto a la literatura publicada sobre el uso del agua superoxidizada (SASO) como irrigante en endodoncia para eliminar al *Enterococcus faecalis*, son muy pocos los artículos encontrados.

En un estudio llevado a cabo por Zan et al. comparte algunos puntos de la metodología que utilizamos en nuestro estudio experimental. En este estudio se tomaron 120 premolares uni radiculares a los que se inoculó con *Enterococcus faecalis*, y por días, hasta los 10 días, se siguió inoculando para generar un biofilm que se mantuvo en estufa a 37°C, estos dientes luego fueron irrigados con solución salina, con hipoclorito de sodio y con SASO. En este estudio, se utilizó SASO durante 3 y 5 minutos en conductos radiculares humanos infectados por biopelículas de *E. faecalis*. El estudio indicó un elevado efecto antimicrobiano del SASO tras 3 y 5 minutos de tiempo de contacto en conductos radiculares. La SASO también mostró un efecto antibacteriano similar al del

NaOCl al 5,25% en el estudio. A pesar de algunas variables, como el periodo de irrigación, las muestras experimentales y los tipos de microorganismos, los resultados del estudio son coherentes con los estudios mencionados anteriormente respecto a la eficacia del hipoclorito de sodio. Estos resultados muestran una relación directamente proporcional entre el efecto antibacteriano del agua superoxidada y el tiempo de exposición. A la luz de este estudio in vitro, la SASO mostró propiedades antimicrobianas contra la biopelícula de *E. faecalis*, y se observó que su uso prolongado en el conducto radicular potenciaba su actividad. La SASO mostró actividad antimicrobiana sobre la biopelícula de *E. faecalis* en conductos radiculares con un caudal de 10mL/min durante 3 minutos. El agua superoxidada es eficaz en términos de reducción de *E. faecalis*, y tiene potencial para ser un irrigante eficaz del conducto radicular. Además, es un agente eficaz para eliminar los restos y la capa de barrillo dentinario ⁽⁶⁰⁾ y no es tóxico en el tercio apical del conducto. Concluyeron que, como nuevo antiséptico, el agua superoxidada tuvo un efecto altamente antibacteriano contra las biopelículas de *E. faecalis* en los conductos radiculares. Además, el agua superoxidada mostró un efecto bactericida notable y similar al del NaOCl tradicional contra las biopelículas de *E. faecalis* ⁽⁶¹⁾.

Otro estudio in vitro llevado a cabo por Rossi-Fedele et al. sobre un modelo de canal radicular de diente bovino demostró que las acciones desinfectantes del agua superoxidada se ven fuertemente reducidas en presencia de contaminación orgánica. El modelo utilizado en este estudio permite un mayor crecimiento bacteriano del que se podría esperar en una situación in vivo. Además, excluye el aspecto mecánico de la preparación del conducto radicular, por lo que es probable que la biomasa bacteriana presente en el conducto radicular sea mayor que en condiciones clínicas normales. En consecuencia, su eliminación dependerá exclusivamente de los efectos de lavado y químicos de la solución de irrigación probada. Se ha demostrado la importancia de la instrumentación para obtener una reducción significativa del contenido bacteriano. Por lo tanto, la hipótesis es que, en presencia de una carga bacteriana reducida, como resultado de una preparación quimio-mecánica (lo que sería la situación real in vivo), la irrigación con agua superoxidada podría tener la capacidad de erradicar una infección del conducto radicular clínicamente más relevante. Una de las ventajas del agua superoxidada, en comparación con el NaOCl, es su nivel de toxicidad. Cabe destacar que el mecanismo de acción del agua superoxidada implica un daño oxidativo que podría causar envejecimiento y disfunciones irreversibles que finalmente producen la muerte celular ⁽²⁷⁾.

Otro estudio llevado a adelante por Savadkouhi et al. demostró resultados similares a los descritos anteriormente por los autores mencionados, concluyendo que el hipoclorito sódico provocó una

reducción del 100% del grosor de la biopelícula y de las UFC/mL de *E. faecalis*, pero el agua superoxidizada mostró una reducción del 98% del grosor de la biopelícula y del 90% de las UFC/mL del microorganismo. Según este estudio in vitro, el agua superoxidizada es menos eficaz en los conductos radiculares infectados que la solución de hipoclorito ⁽⁶²⁾.

Como fue descrito, hay evidencia comparable con los resultados de nuestro estudio experimental in vitro. Se puede observar que en la literatura hay estudios frente al *E. faecalis*, con los diferentes antisépticos, pero no uno que involucre a los 3 y los compare.

Si comparamos los resultados obtenidos con los resultados de otros autores se podría sostener que se llegó a una conclusión similar, el hipoclorito de sodio y el PDT lograron reducir significativamente la carga bacteriana, por lo tanto, las UFC, pero no eliminarlas al 100%. Sin embargo, la SASO fue la que tuvo mejor resultado e impacto clínico, ya que mostró reducir significativamente las UFC, como lo reportan Rossi-Fedele et al. en su estudio.

Comparando nuestros resultados con los de Savadkouhi et al. podemos decir que nuestros resultados obtenidos son contradictorios, ya que se obtuvo mejor respuesta para el SASO que para el hipoclorito de sodio.

También consideramos destacar como lo relatan algunos de estos autores en sus trabajos, que el microorganismo, al incubarlo solo 24 hrs, y al estar en un diente estéril, no forma un biofilm, ni le da tiempo de penetrar en los canalículos dentinarios, por lo que muchas veces puede presentarse en estado planctónico y ser eliminado de la luz del conducto por el mismo barrido mecánico del líquido antiséptico.

Conclusiones

Existe respuesta de la bacteria *E. faecalis* frente al uso de los 3 antisépticos evaluados. Es posible afirmar que comparando la SASO con la PDT y la solución de hipoclorito de sodio; tuvo una actividad antimicrobiana destacada frente a los otros 2 antisépticos, quienes demostraron tener una eficacia similar.

Estos tratamientos han demostrado lograr una disminución en las UFC, considerando la aplicación clínica se puede sugerir que su uso sería optimizado si se combinan para una mayor acción de los mismos.

Además, cabe destacar que hay poca evidencia reportada con respecto a la SASO. Por ello, se pueden generar nuevas líneas de investigación para probar frente a otros microorganismos que se encuentren en la infección de causa odontogénica y quizás encontrar una alternativa u otra opción al uso de hipoclorito de sodio disminuyendo las reacciones adversas que éste presenta.

Es importante comprender y relacionar con la aplicación clínica que puede tener este estudio, teniendo en cuenta que hoy en día los microorganismos son más resistentes, como también sabemos que la terapia antimicrobiana sistémica no es útil para las infecciones secundarias causadas por *E. faecalis*, debemos apostar a técnicas locales para la antisepsia y control de la infección en endodoncia.

Referencias

1. López Fernández R, Téllez Rodríguez J, Rodríguez-Ramírez A. Las infecciones odontogénicas y sus etapas clínicas. *Acta Pediátrica México*. 2016;37(5):302.
2. Mas A, Frutos E De, Luisa M, Agustí M. Atención Primaria consultas de atención primaria : ¿ antibiótico ? Elsevier. 2017;49(10).
3. Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPFA. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clin Oral Investig*. 2021;25(4):2017–27.
4. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(1):85–94.
5. Correa JMA. *Revista de Medicina Isla de la Juventud*, Vol. 12, No. 1 (2011). 2011;12(1):1–12.
6. Lilian Toledo Reyes AL, Benítez RVÁ. Factores asociados al fracaso de la terapia de conductos radiculares Factors associated to the failure of the root. 2018;21(2):93–102.
7. Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *Eur J Dent*. 2016;10(1):144–7.
8. Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: Why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001;34(1):1–10.
9. Siqueira JFJ, Rôças IN, Lopes HP, de Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endod*. 1999 Jan;25(1):14–6.
10. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent*. 2010 Oct;13(4):233–9.
11. Natalia Nemer Molina, María del Cisne Centeno Dávila, José Artieda Sáenz DCV. Microbial resistance factors of *Enterococcus Faecalis* Associated. *Espec Odontológicas UG*. 2022;5(2).
12. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2019;24(3):e364–72.
13. Loiacono, Romina; Pérez, S; Anaise, C; Pinasco, Laura; Tejerina, Denise Paula; Gliosca, Laura Alejandra; Molgatini, Susana Liliana; Rodríguez PA. Comparación de la efectividad antimicrobiana entre hipoclorito de sodio 2, 5% y ácido hipocloroso 5% frente a *Enterococcus faecalis*: prueba in vitro. *Rev Fac Odontol*. 2021;36(84):7–11.
14. Pupo Marrugo S, DíAz Caballero A, Castellanos Berrio P, Simancas Escorcía V. Eliminación

de enterococcus faecalis por medio del uso de hipoclorito de sodio, Clorhexidina y mtad en conductos radiculares. *Av Odontoestomatol.* 2014;30(5):263–70.

15. Jhajharia K, Mehta L, Parolia A, Shetty Kv. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5(1):1.
16. Natalia P. Nemer Molina, María del Cisne Centeno Dávila, José G Artieda Sáenz DCCV. Factores de resistencia microbiana de *Enterococcus faecalis* asociado a los fracasos endodónticos. Revisión de literatura. *Rev Canal Abierto.* 2022;46:24–8.
17. Del Fabbro M, Samaranayake LP, Lolato A, Weinstein T, Taschieri S. Analysis of the secondary endodontic lesions focusing on the extraradicular microorganisms: an overview. *J Investig Clin Dent.* 2014;5(4):245–54.
18. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93–8.
19. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(5):308–20.
20. Ran S, Liu B, Jiang W, Sun Z, Liang J. Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. *Front Microbiol.* 2015;6(AUG):1–11.
21. Appelbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(3):169–74.
22. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod.* 2006;32(5):389–98.
23. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2005;38(1):22–9.
24. Abuhaimeed TS, Neel EAA. Sodium Hypochlorite Irrigation and Its Effect on Bond Strength to Dentin. *Biomed Res Int.* 2017;2017.
25. Gonçalves LS, Rodrigues RCV, Andrade Junior CV, Soares RG, Vettore MV. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine as irrigant solutions for root canal disinfection: A systematic review of clinical trials. *J Endod.* 2016;42(4):527–32.
26. Guivarc’h M, Ordioni U, Ahmed HMA, Cohen S, Catherine JH, Bukiet F. Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review. *J Endod.* 2017;43(1):16–24.
27. Rossi-fedele L, Antonio J, Figueiredo P De, Steier L, Canullo L, Steier G, et al. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox®) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(5):498–502.
28. Tanaka H, Hirakata Y, Kaku M, Yoshida R, Takemura H, Mizukane R, et al. Antimicrobial activity of superoxidized water. *J Hosp Infect.* 1996;34(1):43–9.
29. Selkon JB, Babb JR, Morris R. Evaluation of the antimicrobial activity of a new super-oxidized water, Sterilox®, for the disinfection of endoscopes. *J Hosp Infect.* 1999;41(1):59–70.

30. Prazmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, Mielczarek A. Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25(4):799–807.
31. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106(June):1098–107.
32. Plotino G, Grande NM, Mercade M. Photodynamic therapy in endodontics. *Int Endod J*. 2019;52(6):760–74.
33. Chen T, Yang D, Lei S, Liu J, Song Y, Zhao H, et al. Photodynamic therapy-a promising treatment of oral mucosal infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2022;39(July):103010. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103010>
34. Schneider S. A comparison of canal preparation in straight and curved root canal. *Oral Surg*. 1971;V.32:p.271-5.
35. Schäfer E, Diez C, Hoppe W TJ. Roentgenographic investigation of frequency and degree of canal curvatures in human permanent teeth. *J Endod*. 2002;28(3):211–6.
36. A. Seidberg. Frequency of two mesiobuccal root canals in maxillary permanent first molars. *J Am Dent Assoc*. 1973;87(1):852–6.
37. Estrela C, Bueno M, Sousa Neto M DJ. Method for determination of root curvature radius using cone-beam computed tomography images. *Braz Dent J*. 2008;19(2):114–8.
38. Kuştarci A, Sümer Z, Altunbaş D, Koşum S. Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an ex vivo study. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2009;107(5):73–9.
39. William H. Kruskal and W. Allen Wallis. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47 (260): 583–621, December 1952.
40. Hollander; Wolfe, Douglas A. (1999). *Nonparametric Statistical Methods* (2nd ed.). ISBN 0-471-19045-4.
41. R Foundation for Statistical Computing, Vienna A. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Available from: <https://www.r-project.org>
42. Mallya L, Shenoy R, Mala K, Shenoy S. Evaluation of the antimicrobial efficacy of 20% *Punica granatum*, 0.2% chlorhexidine gluconate, and 2.5% sodium hypochlorite used alone or in combinations against *Enterococcus faecalis*: An in-vitro study. *J Conserv Dent*. 2019;22(4):367–70.
43. Siqueira JFJ, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000 Jun;26(6):331–4.
44. Shahram Vaziri, Ali Kangarlou, Razieh Shahbazi, Amin Nazari-Nasab MN. 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(8):139–41.

45. Sinha N, Asthana G, Parmar G, Langaliya A, Shah J, Kumbhar A, et al. Evaluation of Ozone Therapy in Endodontic Treatment of Teeth with Necrotic Pulp and Apical Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. *J Endod* [Internet]. 2021;47(12):1820–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.09.006>
46. Souza LC, Brito PRR, Machado de Oliveira JC, Alves FRF, Moreira EJJ, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010;36(2):292–6.
47. Nair RM, Jayasree S, Poornima ES, Ashique M. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy on *Enterococcus faecalis* and smear layer removal in curved canals by different irrigation techniques: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2022;25(4):409–14.
48. 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* [Internet]. 2011;37(6):856–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.03.014>
49. Tennert C, Drews AM, Walther V, Altenburger MJ, Karygianni L, Wrbas KT, et al. Ultrasonic activation and chemical modification of photosensitizers enhances the effects of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* root-canal isolates. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2015;12(2):244–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.02.002>
50. Marjut Sakko LTRR-R. *Microbiologia Conducto Radicular*. *Prim Dent J*. 2016;2(5):8489.
51. Mozayeni MA, Vatandoost F, Asnaashari M, Shokri M, Azari-Marhabi S, Asnaashari N. Comparing the Efficacy of Toluidine Blue, Methylene Blue and Curcumin in Photodynamic Therapy Against *Enterococcus Faecalis*. *J Lasers Med Sci*. 2020;11(Suppl 1):S49–54.
52. de Oliveira BP, Aguiar CM, Câmara AC. Photodynamic therapy in combating the causative microorganisms from endodontic infections. *Eur J Dent*. 2014 Jul;8(3):424–30.
53. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006;38(5):468–81.
54. Hegde V. *Enterococcus faecalis*; clinical significance & treatment considerations. *Endontology*. 2009;21(2):48.
55. Berutti E. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod*. 1997;23(12):725–7.
56. Bumb SS, Bhaskar DJ, Agali CR, Punia H, Gupta V, Singh V, et al. Assessment of photodynamic therapy (PDT) in disinfection of deeper dentinal tubules in a root canal system: An in vitro study. *J Clin Diagnostic Res*. 2014;8(11):ZC67–71.
57. Prazmo EJ, Godlewska RA, Mielczarek AB. Effectiveness of repeated photodynamic therapy in the elimination of intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2017;32(3):655–61.

58. George S, Kishen A. Advanced Noninvasive Light-activated Disinfection: Assessment of Cytotoxicity on Fibroblast Versus Antimicrobial Activity Against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007;33(5):599–602.
59. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, et al. Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy: Safety Assessment in Mammalian Cell Cultures. *J Endod*. 2009;35(11):1567–72.
60. Rocas I, Siquera J, Santos K. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular. *J Endod*. 2004;30(19):315–20.
61. Zan R, Alacam T, Hubbezoglu I, Tunc T, Sumer Z, Alici O. Antibacterial Efficacy of Super-Oxidized Water on *Enterococcus faecalis* Biofilms in Root Canal. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(9).
62. Tour Savadkouhi S, Mohtasham Maram M, Purhaji Bagher M, Afkar M, Fazlyab M. In Vitro activity of superoxide water on viability of *Enterococcus faecalis* biofilm on root canal wall. *Iran Endod J*. 2021;16(3):189–92.

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer a mi tutora, la Profa. Dra. Beatriz Vilas que estuvo en todo momento guiando mi trabajo y por su apoyo incondicional.

Luego a la Dra. Lourdes Zaffaroni, quién me ayudó con toda la parte práctica de laboratorio, por las horas de trabajo y por su paciencia y dedicación.

Al Prof. Agdo. Dr. Ramón Álvarez, quien con dedicación y responsabilidad supervisó la parte estadística del trabajo.

A mi pareja, quien siempre supo entender y acompañar en mis días y momentos de estudio, sin importar que día u hora era.

A la Facultad de Odontología, por darme la oportunidad para poder crecer y cursar esta carrera de Maestría y a los docentes que compartieron su conocimiento y tiempo.

Al tribunal, por su tiempo de leer la tesis y estar en la instancia de evaluación y sobre todo por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo que tiene muchos actores y gran esfuerzo.

Apéndices

Apéndice 1. Tabla de valores del recuento de UFC, por duplicado, antes de aplicado el tratamiento (“no tratado”) y luego de aplicado el antiséptico (“tratado”).

Del N° de placa 1 al 25 corresponde al Hipoclorito de sodio, del 26 al 50 a la SASO, del 51 al 75 a la PDT y del 76 al 100 al suero.

N° de P	No tratado	Tratado	N° de Placa	No tratado	Tratado
1.1	75	68	51.1	39	21
1.2	129	90	51.2	29	7
2.1	389	66	52.1	504	108
2.2	135	45	52.2	344	72
3.1	363	107	53.1	336	106
3.2	312	162	53.2	529	129
4.1	244	89	54.1	130	6
4.2	196	84	54.2	62	18
5.1	322	77	55.1	189	14
5.2	402	127	55.2	89	11
6.1	260	42	56.1	167	69
6.2	384	32	56.2	140	52
7.1	58	1	57.1	105	30
7.2	66	1	57.2	28	1
8.1	50	21	58.1	358	25
8.2	250	19	58.2	222	67
9.1	15	1	59.1	224	60
9.2	20	0	59.2	156	47
10.1	48	0	60.1	158	27
10.2	33	0	60.2	99	49
11.1	306	1	61.1	35	16
11.2	229	0	61.2	39	10
12.1	302	0	62.1	32	15
12.2	292	0	62.2	28	1
13.1	370	27	63.1	44	1
13.2	354	58	63.2	43	4
14.1	63	0	64.1	223	14
14.2	37	0	64.2	268	15
15.1	361	45	65.1	324	20
15.2	190	27	65.2	316	28
16.1	210	19	66.1	41	2
16.2	234	1	66.2	168	3
17.1	62	13	67.1	146	5
17.2	71	15	67.2	244	6
18.1	88	38	68.1	336	48

18.2	43	20	68.2	354	64
19.1	301	202	69.1	58	1
19.2	531	315	69.2	80	1
20.1	62	3	70.1	140	2
20.2	67	0	70.2	174	1
21.1	53	4	71.1	170	0
21.2	83	2	71.2	208	3
22.1	570	45	72.1	356	53
22.2	668	35	72.2	485	77
23.1	58	10	73.1	189	6
23.2	51	1	73.2	156	7
24.1	241	46	74.1	41	22
24.2	246	23	74.2	224	29
25.1	74	8	75.1	41	24
25.2	453	12	75.2	224	29
26.1	425	2	76.1	840	174
26.2	298	1	76.2	109	15
27.1	27	2	77.1	306	78
27.2	31	27	77.2	204	104
28.1	27	2	78.1	246	138
28.2	50	0	78.2	396	255
29.1	362	0	79.1	88	62
29.2	224	5	79.2	100	64
30.1	56	0	80.1	285	255
30.2	40	0	80.2	348	294
31.1	30	0	81.1	281	282
31.2	50	0	81.2	163	74
32.1	309	4	82.1	213	165
32.2	215	1	82.2	366	276
33.1	120	1	83.1	579	525
33.2	93	3	83.2	318	286
34.1	85	0	84.1	660	426
34.2	79	0	84.2	492	360
35.1	3	0	85.1	546	381
35.2	12	0	85.2	417	345
36.1	44	5	86.1	84	48
36.2	90	8	86.2	60	39
37.1	80	0	87.1	90	76
37.2	59	0	87.2	123	117
38.1	20	2	88.1	281	296
38.2	23	1	88.2	170	108
39.1	251	0	89.1	86	69
39.2	189	0	89.2	134	89
40.1	84	7	90.1	316	156
40.2	89	7	90.2	420	121
41.1	61	1	91.1	374	167

41.2	33	1	91.2	284	31
42.1	192	6	92.1	494	165
42.2	124	1	92.2	172	128
43.1	37	2	93.1	346	173
43.2	42	2	93.2	260	85
44.1	46	1	94.1	393	248
44.2	70	5	94.2	279	264
45.1	161	17	95.1	230	240
45.2	135	19	95.2	690	344
46.1	54	0	96.1	944	242
46.2	37	0	96.2	120	231
47.1	70	0	97.1	155	243
47.2	67	0	97.2	323	201
48.1	84	2	98.1	369	239
48.2	71	3	98.2	90	55
49.1	8	3	99.1	612	258
49.2	14	3	99.2	316	256
50.1	122	9	100.1	409	195
50.2	89	4	100.2	712	241

Anexos

Anexo 1. Aprobación del Comité de Ética.



Montevideo, 19 de diciembre de 2023.-

Doctor,
Martín Puch.

Se comunica a usted la resolución adoptada por el Comité de Ética de fecha 14/12/23;

RESOLUCIÓN No. 4.

Exp. 091900-000027-23.- APROBAR el Proyecto titulado "Comparación del efecto antimicrobiano de hipoclorito de sodio, agua superoxidizada y terapia fotodinámica frente al enterococcus faecalis en endodoncia", presentado por el Dr. Martín Puch. (4 en 4).

Sin otro particular, saluda atentamente;

Dra. Alicia Picapedra
Coordinadora del Comité de Ética

Anexo 2. MALDI TOF de *E. faecalis* realizado en el Departamento de Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas.

