UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENDODONCIA

“Evaluación de un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto”

AUTOR:

C.D. María Fernanda Simón Flores

DIRECTOR:

Ricardo Oliva Rodríguez, PhD

CODIRECTORA:

Ana María González Amaro, MsC

ASESORA:

Marlen Guadalupe Vitales Noyola, PhD

ASESORA:

Norma Verónica Zavala Alonso, PhD

San Luis Potosí, S.L.P noviembre 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENDODONCIA

"Evaluación de un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto"

AUTOR:

C.D. María Fernanda Simón Flores

Tesis presentada para obtener el grado de:

MAESTRO EN ENDODONCIA

DIRECTOR DE TESIS……Ricardo Oliva Rodríguez, PhD

CODIRECTORA DE TESIS…… Ana María González Amaro, MsC

ASESORA……Marlen Guadalupe Vitales Noyola, PhD

ASESORA……...Norma Verónica Zavala Alonso, PhD

San Luis Potosí, S.L.P noviembre 2024

“Evaluación de un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto”

AUTOR:

C.D. María Fernanda Simón Flores

MAESTRO EN ENDODONCIA

DIRECTOR DE TESIS……. Ricardo Oliva Rodríguez, PhD

Profesor-Investigador

Maestría en Endodoncia,

Facultad de Estomatología, UASLP

CODIRECTOR……Ana María González Amaro, MsC.

Profesor- Investigador

Maestría en Endodoncia,

Facultad de Estomatología, UASLP

ASESOR…….. Marlen Guadalupe Vitales Noyola, PhD

Profesor- Asignatura

Maestría en Endodoncia,

Facultad de Estomatología, UASLP

ASESOR…….. Norma Verónica Zavala Alonso, PhD

Profesor- Investigador

Maestría en Endodoncia,

Facultad de Estomatología, UASLP

San Luis Potosí, S.L.P noviembre 2024

“Evaluación de un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto”

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis PotosÍ, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia, por los siguientes asesores:

Ricardo Oliva Rodríguez PhD

Ana María González Amaro MsC

Marlen Guadalupe Vitales Noyola PhD

Norma Verónica Zavala Alonso, PhD

San Luis Potosí, S.L.P noviembre 2024

“Evaluación de un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto”

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia, por los siguientes sinodales:

María Verónica Méndez González MsC

Selene Velázquez Moreno PhD

Alejandro López Aldrete PhD

San Luis Potosí, S.L.P noviembre 2024

“Evaluación de un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto”

C.D. María Fernanda Simón Flores

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia, por las siguientes autoridades:

Dr. Alan Martínez Zumarán
Director de la Facultad de Estomatología.

Dra. María Verónica Méndez González
Coordinadora de la Maestría en Endodoncia.

Dra. Yolanda Hernández Molinar
Jefa de la División de posgrados de la Facultad de Estomatología

San Luis Potosí, S.L.P noviembre 2024

DEDICATORIA

A todas aquellas personas que, impulsadas por sus sueños y su pasión por el conocimiento, dejaron atrás sus hogares, familias y amigos para perseguir un nuevo horizonte académico en otra ciudad. Esta tesis es un reflejo de su valentía y determinación, de las noches de soledad convertidas en esfuerzo y de las horas de estudio que sustituyeron la comodidad de estar en casa.

A ustedes, que sacrificaron momentos importantes y enfrentaron nuevos desafíos con resiliencia, les dedico este trabajo. Que su experiencia inspire a otros a buscar sus propios caminos, aunque impliquen distancia y sacrificio. Su esfuerzo es la prueba de que la búsqueda de conocimiento no tiene fronteras y que el verdadero hogar se encuentra en cada paso que damos hacia nuestros sueños.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi familia por su amor incondicional, apoyo constante y sacrificios incansables durante estos años de viaje académico.

A mi mamá, tu amor, sacrificio y dedicación han sido la fuerza que me ha motivado a lograr mis metas. Gracias por ser mi inspiración todos los días. A mi hermano, gracias por tu comprensión de los desafíos y sacrificios que implica este camino académico. En medio de tus propias responsabilidades y desafíos, siempre has encontrado tiempo para escucharme, alentarme y aconsejarme.

A mi esposo Guillermo, mi compañero de vida y de posgrado. Gracias por tu apoyo emocional, por tu paciencia infinita y tus palabras de aliento. Tu presencia en mi vida hizo este camino más bonito y llevadero. Estoy eternamente agradecida por tenerte a mi lado y poder aprender contigo y de ti.

A la maestra Anita, doctora Marlen y doctora Selene que, a través de sus explicaciones detalladas, su paciencia y su tiempo, han hecho que cada paso del proceso sea comprensible e interesante para mí. Sin su orientación, esto no habría sido posible.

A mis amigos, quienes han estado a mi lado en cada paso del camino, gracias por entender mis ausencias, escucharme y acompañarme en mis momentos de estrés y locura, pero también por celebrar cada pequeño triunfo conmigo.

A la UASLP quiero expresar mi gratitud por brindarme los recursos, el conocimiento y las oportunidades para crecer tanto académica como personalmente. A mis profesores, les debo un profundo reconocimiento por su guía, inspiración y dedicación. Su pasión por la enseñanza ha dejado una huella en mi corazón.

"Evaluación de un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto" by María Fernanda Simón Flores is licensed under CC BY-NC-ND 4.0



Índice

INTRODUCCIÓN 4
1 MARCO TEÓRICO 6
1.1 Biofilm 8
1.2 Hipoclorito de Sodio 11
1.3 Solución enzimática 12
1.4 Solución hiperosmótica 13
2 JUSTIFICACIÓN 15
2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 16
3 OBJETIVOS 17
3.1 Objetivo general 17
3.2 Objetivos específicos 17
4 HIPÓTESIS 18
5 METODOLOGÍA 19
5.1 Lugar de realización 19
5.2 Diseño de estudio 19
5.2.1 Tamaño de muestra 19
5.2.2 Grupos de estudio 19
5.3 Criterios de selección de las muestras 20
5.3.1 Criterios de inclusión 20
5.3.2 Criterios de exclusión 20
5.3.3 Criterios de eliminación 20
5.4 Definición conceptual y operacional de las variables 21
5.4.1 Variables independientes 21
5.4.2 Variables dependientes 21
5.5 Análisis estadístico 22
5.6 Consideraciones éticas 22
5.7 Metodología experimental 23
5.7.1 Fase de preparación de las muestras 23
5.7.2 Formación de biofilm mixto de *E. Faecalis* y *C. Albicans* por método estático 24

5.7.3 Elaboración de las soluciones irrigantes 27
5.7.4 Instrumentación: utilizando las soluciones a probar 27
5.7.5 Evaluación mediante conteo de UFC 24
5.7.6 Evaluación en Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) 26
6 RESULTADOS 29
6.1 Medición de la turbidez de las muestras con escala de McFarland 30
6.2 Capacidad antimicrobiana por medio del conteo de UFC pre y post instrumentación .. 34
6.3 Observación de muestras en el MEB 36
7 DISCUSIÓN 43
8 CONCLUSIONES 48
9 PERSPECTIVAS 48
10 REFERENCIAS 49
11 ANEXOS 53

“Evaluación de un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto”

Autora: C.D. María Fernanda Simón Flores
Maestría en Endodoncia
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Noviembre 2024, San Luis Potosí, México

Resumen: La terapia de conductos radiculares busca eliminar la infección en el sistema de conductos y prevenir su reaparición, aunque la permanencia de microorganismos es una causa común de fracaso en el tratamiento. Este fracaso suele estar relacionado con una preparación y obturación inadecuadas del conducto, permitiendo la formación de un biofilm resistente que evade el sistema inmunológico y no responde a los irrigantes convencionales. Es esencial usar irrigantes efectivos que disgreguen y eliminen el biofilm, sin causar efectos secundarios y siendo biocompatibles. Este estudio propone un protocolo con dos soluciones, enzimática e hiperosmótica, que han mostrado resultados prometedores y podrían mejorar los resultados en la terapia de conductos.

Objetivo: Evaluar un protocolo de irrigación endodóntica basado en una solución enzimática e hiperosmótica en un biofilm mixto.

Materiales y métodos: *E. faecalis* y *C. albicans* fueron inoculados en 36 raíces dentales humanas, se desarrolló un biofilm mixto durante 28 días, después de lo cual se dividieron en 3 grupos (12 muestras por grupo) y se irrigaron con las siguientes soluciones: NaClO al 2.25%, solución salina y la solución en estudio: enzimática + hiperosmótica. Se realizó un conteo de UFC, así como lecturas en el MEB.

Resultados: En el grupo irrigado con NaClO se observó una reducción del 100% en el conteo de UFC, mientras que en el grupo irrigado con la solución enzimática + hiperosmótica se observó una reducción de menos del 10%.

Conclusión: Las enzimas no tuvieron efecto sobre los polímeros del biofilm maduro. La solución hiperosmótica logra eliminar microorganismos en estado planctónico; sin embargo, al no estar expuestos, no pudieron ser eliminados.

INTRODUCCIÓN

La terapia de conductos radiculares tiene como principales metas la erradicación de la infección presente en el sistema de conductos y la prevención de su recurrencia. La persistencia de microorganismos en esta área representa una de las razones más frecuentes del fracaso en este tipo de tratamiento. Aunque la endodoncia se considera generalmente como un procedimiento predecible, con tasas de éxito que varían entre el 86% y el 98%, su evaluación se fundamenta en los signos y síntomas clínicos, así como en los hallazgos radiográficos del diente intervenido. Para considerar exitoso el tratamiento, debe de haber ausencia de dolor e inflamación, reducción o desaparición de lesiones visibles en las radiografías, y que se le haya devuelto o mantenido la capacidad funcional y estabilidad del diente dentro del alvéolo.

Sin embargo, los fracasos más comunes están relacionados con una preparación inadecuada del conducto y una obturación deficiente del mismo, lo que facilita la persistencia de bacterias y la formación de un biofilm resistente. Este biofilm, compuesto por diversas especies microbianas, se adhiere a la superficie radicular tanto interna como externamente, mostrando una notable resistencia a los irrigantes, medicamentos y soluciones empleadas durante el tratamiento, además de ser capaz de evadir la respuesta inmunológica del huésped.

Por lo tanto, resulta crucial el uso de irrigantes efectivos que permitan desorganizar y eliminar este biofilm. Aunque en el mercado existen numerosas opciones de productos para este fin, ninguna cumple de manera integral con todas las características deseadas. Se busca un irrigante que no solo logre una desinfección adecuada, sino que también sea biocompatible con los tejidos periapicales, no altere la estructura dentinaria, no cause efectos secundarios en caso de extrusión, que esté disponible y sea accesible para el endodoncista.

En este contexto, el presente estudio propone un protocolo de irrigación que emplea dos soluciones diferentes: una enzimática y otra hiperosmótica. Estas soluciones,

respaldadas por investigaciones previas, han demostrado resultados prometedores y cumplen con las características mencionadas anteriormente, lo que sugiere su eficacia y su potencial para mejorar los resultados de la terapia de conductos radiculares.

1 MARCO TEÓRICO

Dentro del sistema de conductos hay entidades altamente organizadas las cuales representan uno de los factores más importantes para la persistencia de infecciones intrarradiculares denominadas biopelículas. Existen ciertas características como la complejidad, variabilidad y la naturaleza del sistema de conductos que hacen que su desinfección resulte desafiante para el operador. Las bacterias que la conforman son particularmente inmunes al tratamiento debido a su resistencia a la penetración de los antimicrobianos y expresan fenotipos más virulentos cuando crecen dentro de las biopelículas comparadas con las formas planctónicas.(1)

Dentro de las biopelículas existen estructuras microbianas conocidas como Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS). Algunas de las funciones de estas sustancias son: defender a los microorganismos contra las agresiones ambientales, incluidos los antibióticos, la sequedad, los detergentes, etc. Estos biopolímeros incluyen polisacáridos, proteínas, nucleótidos y lípidos, que juegan un papel central en la adhesión y supervivencia de las bacterias.(2)

Los polisacáridos, polipéptidos y algunas veces el ADN extracelular afectan la estabilidad y la adherencia a la superficie de la matriz del biofilm. Las cargas negativas de los grupos funcionales químicos incorporan cationes, por ejemplo, Ca^{2+} y Mg^{2+}, que estabilizan aún más la matriz del biofilm.(3)

Las membranas celulares microbianas y las paredes celulares contienen lípidos, glicolípidos y proteínas de membrana integradas unidas con polisacáridos extracelulares. Las enzimas que pueden romper los enlaces de glucósidos o péptidos, o un surfactante, que altera las interacciones polares, o los quelantes que unen cationes, podrían ser herramientas útiles para desestabilizar la matriz del biofilm. (4)

Dentro de una biopelícula, se encuentra una amplia variedad de bacterias que forman una comunidad de múltiples especies; sin embargo, *E. faecalis* se ha

encontrado con mayor frecuencia en infecciones intrarradiculares persistentes. Es una bacteria anaeróbica facultativa grampositiva que puede sobrevivir en condiciones adversas debido a su capacidad para crear biopelículas, competir con otros microorganismos, invadir los túbulos dentinarios y resistir la privación nutricional.(5) Ha sido aislado de infecciones secundarias persistentes y es difícil de erradicar, debido a su alta adaptabilidad para sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables. (1)

Si bien, es sabido que la instrumentación por sí sola no logra desbridar eficazmente la materia que se encuentra en los conductos radiculares, especialmente debido a su compleja morfología; además, las bacterias pueden penetrar profundamente en los túbulos dentinarios hasta 1500 µm del conducto radicular.(1) Por esta razón los tratamientos de conductos son complementados por agentes irrigantes que permitan tener la acción desinfectante de los restos orgánicos y de quelantes en los inorgánicos.

Como resultado de la instrumentación, el barrillo dentinario es un producto del proceso de conformación de conductos, tiene una estructura cristalina compuesta por residuos orgánicos e inorgánicos, microorganismos y sus subproductos. Tiene un espesor de 1-5 micras y cubre de manera no uniforme las paredes del conducto. (5)

Aunque existen opiniones contradictorias sobre la eliminación o conservación de esta capa, los estudios muestran que es una capa infecciosa que puede proteger a los microorganismos contra el desinfectante del conducto. La combinación de estos factores pone en peligro el establecimiento de un sellado completo, ya que el barrillo dentinario impide que el cemento sellador penetre en los túbulos dentinarios, lo que finalmente conduce a la microfiltración.

Por lo tanto, es esencial utilizar algún método de irrigación y desinfección para eliminar los microorganismos, sus subproductos y el tejido residual, además de remover la capa de barrillo dentinario y otros desechos del sistema de conductos. Estos tratamientos químicos del conducto radicular se pueden clasificar de manera

arbitraria en irrigantes, y medicamentos intraconducto aplicados entre citas; el hidróxido de calcio representa uno de los medicamentos más populares en la endodoncia.(6) Sin embargo, los medicamentos intraconducto tienen una penetración limitada en los túbulos dentinarios, disminuyendo el porcentaje de desinfección y por lo tanto de éxito en el tratamiento.

Actualmente la tendencia es el desarrollo de productos que se empleen en la limpieza y desinfección del sistema de conductos y tener medicamentos o irrigantes específicos para los casos que se presenten en la clínica.

Recientemente se han publicado estudios en proteínas fúngicas, clasificadas como glucósidos hidrolasas, las cuales podrían digerir y descomponer los polisacáridos encontraos en las biopelículas. Un ejemplo de estas enzimas es la glucósido hidrolasa producida por el hongo *Trichoderma reesei*. Esta enzima en particular no ha sido estudiada por su actividad contra las biopelículas maduras intraconducto.

Contextualizando un tratamiento endodóntico en particular, se pueden mencionar los dientes con ápice inmaduro y pulpa necrótica en pacientes jóvenes que aún no terminan su desarrollo. Para esto, es necesario realizar una desinfección adecuada y así crear un microambiente que facilite la repoblación de las áreas con células huésped derivadas de las células madre de la papila apical (SCAP) (7). En este tratamiento, no se recomienda la instrumentación porque podría debilitar las paredes de la dentina. Por esta razón, tanto los agentes irrigantes, como los medicamentos intraconducto, son los responsables en eliminar los microorganismos existentes. La irrigación con Hipoclorito de Sodio (NaClO) en estos casos, posee un alto potencial para la degradación de la materia orgánica, lo cual compromete la integridad de SCAP. (1)

1.1 Biofilm

Históricamente, el redescubrimiento de un fenómeno microbiológico, que originalmente fue observado por Van Leeuwenhoek, en el cual los microorganismos se adhieren y crecen en superficies expuestas de manera generalizada, llevó a

investigaciones que pusieron de manifiesto que los microorganismos que forman biofilms en superficies presentaban diferencias notables en lo que respecta a la transcripción génica y la velocidad de crecimiento. Estos microorganismos que participan en la formación de biofilms activan mecanismos específicos para adherirse inicialmente a una superficie, desarrollar una estructura comunitaria y un ecosistema, y, finalmente, desprenderse.(8)

Por otra parte, en 1894, Miller publicó sus hallazgos sobre la investigación bacteriológica de la pulpa. En esta logró observar muchos microorganismos diferentes en el espacio pulpar infectado y se dio cuenta de que algunos no eran cultivables en comparación con el rango completo observado por microscopía, y que en todos los tercios radiculares (coronal, medio y apical) la flora era diferente. (8)

De acuerdo con Langeland, Ricucci y Siqueira la infección bacteriana del sistema de conductos se da en la presencia de una pulpa necrótica o cuando ésta fue removida en algún tratamiento previo. Una vez establecida la infección en el conducto radicular, avanza en dirección apical, hasta que finalmente las bacterias y/o sus factores de virulencia alcanzan los tejidos perirradiculares y causan inflamación. Luego se establece la periodontitis apical la cual puede ser sintomática o asintomática dependiendo de factores relacionados con el huésped y las bacterias.

El microbioma en el sistema de conductos radiculares se encuentra en entidades altamente organizadas y complejas conocidas como biofilm. La complejidad, la variabilidad del sistema de conductos radiculares junto con la naturaleza del biofilm hacen que la desinfección del conducto radicular sea extremadamente desafiante. Las bacterias son inmunes al tratamiento debido a su resistencia a la penetración de los antimicrobianos y expresan fenotipos más virulentos cuando crecen dentro del biofilm que como formas planctónicas.(2)

El modo de crecimiento en forma de biofilm resulta beneficioso para los microorganismos, ya que les permite crear comunidades estructuradas en tres

dimensiones con canales de fluidos que facilitan el transporte de sustratos, productos de desecho y moléculas señalizadoras. La formación de biofilm en los conductos radiculares probablemente comienza en algún momento después de la primera invasión de la cámara pulpar por microorganismos orales planctónicos, una vez que ha ocurrido cierto deterioro del tejido, como sugieren las hipótesis de Svensäter y Bergenholtz. (8)

Las biopelículas son estructuras microbianas complejas conocidas como sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Estas estructuras defienden a los microorganismos contra las agresiones ambientales, incluidos los antibióticos, la sequedad, los detergentes, etc. Estos biopolímeros incluyen polisacáridos, proteínas, nucleótidos y lípidos, que juegan un papel central en la adhesión y supervivencia de las bacterias. EPS anclan microorganismos a la superficie, manteniendo su integridad estructural. (3) Así pues, Costerton y colaboradores afirmaron que el biofilm está compuesto por células individuales y colonias, todas ellas incrustadas en una matriz polimérica altamente hidratada, predominantemente aniónica.

Otra función de las EPS es que mantienen inmovilizadas a las células del biofilm, permitiéndoles permanecer juntas durante un largo período y facilitando así interacciones intensas, como la comunicación celular, la transferencia horizontal de genes y la formación de microconsorcios sinérgicos.(9)

La estabilidad y la adherencia a la superficie de la matriz del biofilm se ven afectadas principalmente por polisacáridos, polipéptidos y, a menudo, por el ADN extracelular. Las cargas negativas de los grupos funcionales químicos incorporan cationes, que estabilizan aún más la matriz del biofilm.(4)

Por otra parte, las membranas celulares microbianas y las paredes celulares contienen lípidos, glicolípidos y proteínas de membrana integradas unidas con polisacáridos extracelulares. Las enzimas que pueden romper los enlaces de glucósidos o péptidos, o un surfactante, que altera las interacciones polares, o los

quelantes que unen cationes, podrían ser herramientas útiles para desestabilizar la matriz del biofilm. (4)

Aunque existen opiniones contradictorias sobre la eliminación o conservación de esta capa, los estudios muestran que es una capa infecciosa que puede proteger a los microorganismos contra el desinfectante del canal. La combinación de estos factores pone en peligro el establecimiento de un sellado completo, ya que el barrillo dentinario impide que el sellador penetre en los túbulos dentinarios, lo que finalmente conduce a la microfiltración.

1.2 Hipoclorito de Sodio

En 1789, en Javelle, Francia, se obtuvo inicialmente el NaClO al hacer circular cloro gaseoso a través de una solución de carbonato de sodio. El resultado líquido, denominado "Eau de Javelle" o "agua de Javelle", consistía en una solución diluida de hipoclorito de sodio. No obstante, debido a que este proceso demostró ser poco eficiente, se exploraron enfoques alternativos para la producción. Uno de estos métodos consistía en la combinación de cal clorada, conocida como "polvo blanqueador", con carbonato de sodio para generar niveles bajos de cloro disponible. Este procedimiento se utilizaba ampliamente para fabricar soluciones de NaClO destinadas a su empleo como antiséptico en entornos hospitalarios, bajo los nombres comerciales "Eusol" y "solución de Dakin". Durante la Primera Guerra Mundial, Dakin introdujo el uso de hipoclorito de sodio en una solución tamponada al 0,5% para la irrigación de heridas. Posteriormente en 1936 Walker introdujo el uso de clorina de doble potencia, solución de sodio (5% NaClO) como irrigante para el conducto radicular. Es así como hasta la fecha, se ha empleado en todo el mundo como irrigante en el área endodóntica.(10) Y es considerado el estándar de oro de los irrigantes de conductos radiculares debido a sus capacidades antibacterianas y de disolución de tejidos.(11)

Se ha demostrado que el NaClO tiene una actividad antimicrobiana de amplio espectro ya que puede eliminar bacterias vegetativas, bacterias formadoras de

esporas, hongos, protozoos, virus y esporas bacterianas.(12) Sin embargo, dentro de sus desventajas se pueden mencionar su citotoxicidad, sabor desagradable, efecto negativo sobre la elasticidad de la dentina al estar en contacto por periodos prolongados. (13)

1.3 Solución enzimática

En el año 2007 Costerton definión a las biopelículas como comunidades microbianas sésiles adheridas a una superficie y compuestas por células enredadas en una matriz extracelular polimérica autoproducida y que exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la expresión génica. Años después, en 2010 Flemming & Wingender hablaron sobre la importancia de la matriz extracelular polimérica en la morfología, ecología, supervivencia y resistencia de la comunidad de biopelículas microbianas. (14)

Con relación a los polisacáridos, estos desempeñan diversas funciones esenciales para la formación y la integridad del biofilm, tales como la adhesión inicial a superficies, la agregación de células bacterianas, la retención de agua, la estabilidad mecánica, la absorción de nutrientes e iones, el almacenamiento de nutrientes y la unión de enzimas, además de actuar como una barrera protectora contra agentes antimicrobianos y factores de estrés ambiental.

Por lo tanto, la degradación activa de polisacáridos podría ser una estrategia prometedora y ampliamente aplicable para tratar las enfermedades endodónticas ocasionadas por biopelículas. Las hidrolasas de glicósido (GH) son enzimas que rompen los enlaces glucosídicos entre carbohidratos. Cada una de estas enzimas puede ser caracterizadas por el tipo específico de enlace que rompe, como la α-amilasa que hidroliza el enlace α-1,4, la celulasa que hidroliza el enlace β-1,4, o la β-1,3 galactosidasa que hidroliza el enlace β-1,3 (Figura 1). (15) (16)

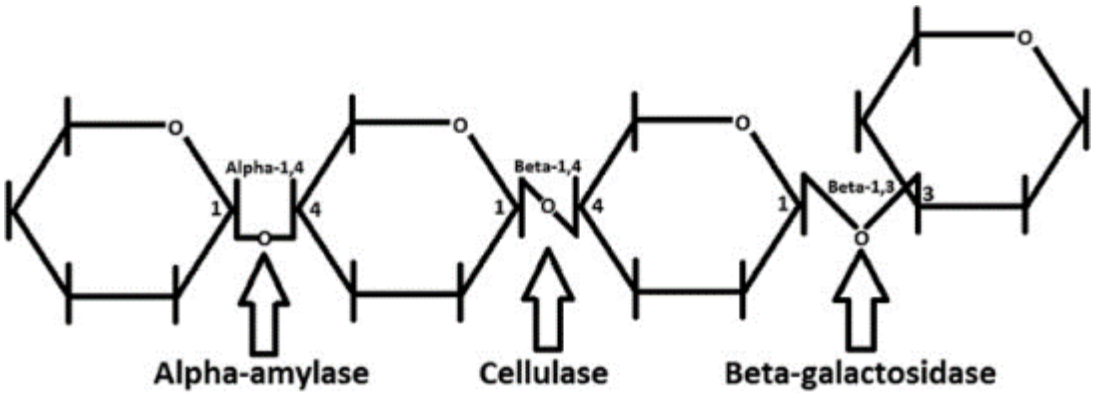


Imagen 1 Se muestran enlaces glucosídicos y las enzimas que los hidrolizan

El enlace glucosídico β-1,4 se observa comúnmente dentro de los exopolisacáridos secretados por una amplia gama de patógenos, el cual es producido por muchas cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella, Citrobacter, Enterobacter, Pseudomonas* y otras bacterias. (17) (18). Mientras que los β-1,3-glucanos dentro de la matriz de la biopelícula *de C. albicans* desempeñan también un papel importante en el secuestro de agentes antifúngicos (19) y en el enmascaramiento de las células fúngicas del reconocimiento por los neutrófilos.(20) (19)

Dado el importante papel de los polisacáridos en la estructura del biofilm, se ha sugerido que la hidrólisis de los enlaces glucosídicos que los unen resultará en la degradación de la matriz de polisacáridos extracelulares (EPS).

1.4 Solución hiperosmótica

Un proceso conocido como plasmólisis (Csonka, 1989) describe cómo un shock hiperosmótico provoca una salida inmediata de agua, resultando en una reducción del volumen citoplasmático de la célula. Una respuesta común a la pérdida temporal de turgencia es la acumulación de "solutos compatibles" en el citoplasma. Estos solutos compatibles son pequeñas moléculas orgánicas que comparten varias características: son solubles en altas concentraciones, pueden

acumularse en niveles muy elevados (hasta 1 M) en el citoplasma de células sometidas a estrés osmótico, no alteran la actividad enzimática y pueden incluso proteger las enzimas de la desnaturalización causada por las sales. Algunos autores han propuesto el uso de soluciones hiperosmóticas para la eliminación de microorganismos en el interior de los conductos radiculares.

La presión osmótica es uno de los parámetros físicos más significativos con los que deben lidiar las bacterias; El estrés osmótico puede consistir en un "choque hiperosmótico" debido a un aumento en la osmolaridad externa, o, por el contrario, un "choque hipoosmótico". (21)

El uso de soluciones hiperosmóticas se ha incrementado en el área microbiológica debido a sus efectos antimicrobianos y su costo de procesamiento relativamente bajo. Las soluciones hiperosmóticas son soluciones sobresaturadas a base de sales de potasio y sodio. La hiperósmosis reduce la disponibilidad de agua de los microorganismos y su entorno, el estrés causado por la hiperósmosis inhibe el crecimiento bacteriano y finalmente provoca la muerte de los microorganismos.

En un ensayo realizado por Galdámez y cols. En 2019 se evaluó el efecto antimicrobiano de una solución hiperosmótica a base de cloruro de sodio y sorbato de potasio en microorganismos en estado planctónico: *E. faecalis* y *C. albicans* aislados de conductos radiculares. Los resultados reportados fueron una reducción total o casi total de la mezcla de microorganismos endodónticos, incluso a altas concentraciones de microorganismos. Se ha informado que el mecanismo de acción de esta solución se debe al choque hiperosmótico que altera la membrana celular de los microorganismos, por reducción del agua disponible, provocando así su muerte. (21)

2 JUSTIFICACIÓN

La elección predominante del hipoclorito de sodio como irrigante para el tratamiento de conductos radiculares se debe a sus reconocidas propiedades desinfectantes y su capacidad para disolver tejido orgánico. Sin embargo, es esencial disponer de alternativas de soluciones irrigantes que se adapten a las necesidades específicas de cada paciente sin comprometer la integridad de la dentina ni causar daño a los tejidos circundantes.

Actualmente existe la necesidad de hacer una búsqueda continua de métodos clínicos para limpiar y desfinfectar el sistema de conductos radiculares sin afectar la adhesión, proliferación y diferenciación de las células madre apicales de la papila (SCAP). Se han investigado alternativas a los irrigantes endodónticos tradicionales, y se han sugerido otras biomoléculas, como enzimas y péptidos, para desintegrar el biofilm intrarradicular. Por ejemplo, estudios sobre proteínas fúngicas, clasificadas como glicósido hidrolasas, han mostrado que pueden digerir y descomponer polisacáridos. Un ejemplo de estas enzimas es la glicósido hidrolasa producida por el hongo *Trichoderma reesei* la cual ha sido estudiada con un biofilm de *E. Faecalis* obteniendo buenos resultados, sin embargo no se ha estudiado su efectividad en un biofilm mixto.

Es por esto, que se plantea la necesidad de desarrollar un protocolo de irrigación que cumpla con los criterios de un irrigante ideal: que sea eficaz en la desinfección de los conductos radiculares, pero que también sea seguro para las células del ligamento periodontal y los tejidos perirradiculares, y por último, que no afecte las propiedades de la dentina. Este protocolo busca proporcionar una solución que pueda aplicarse de manera amplia, abordando las diversas necesidades de los pacientes y promoviendo un enfoque más seguro y biocompatible en el tratamiento endodóntico en dientes con raíces inmaduras.

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica eficaz para la desinfección y disgregación de biofilm mixto de origen endodóntico?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto.

3.2 Objetivos específicos

- Formar un biofilm mixto conformado por *E. faecalis* y *C. albicans* en raíces de dientes extraídos.
- Evaluar la capacidad antibacteriana de la solución enzimática e hiperosmótica y del NaClO 2.25% en biopelículas mixtas de *E. faecalis y C. albicans* mediante UFC
- Evaluar la disminución de biofilm mixto post instrumentación mediante el análisis de micrografías obtenidas con el MEB utilizando la escala de Rome. (22)

4 HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN (Hi): El protocolo de irrigación a base de una solución enzimática e hiperosmótica tendrá un efecto similar en la desinfección y disgregación de biofilm que el hipoclorito de sodio.

HIPÓTESIS NULA (Ho): El protocolo de irrigación a base de una solución enzimática e hiperosmótica tendrá menor efecto de desinfección, y disgregación de biofilm que el hipoclorito de so

5 METODOLOGÍA

5.1 Lugar de realización

- ✓ Laboratorio de Preclínica de la Maestría en Endodoncia de la UASLP
- ✓ Laboratorio de Microbiología de la Maestría en Endodoncia de la UASLP
- ✓ Laboratorio de Microscopía del Doctorado en Ciencias Odontológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

5.2 Diseño de estudio

Transversal Analítico

Tipo de estudio:

Experimental *in vitro*

5.2.1 Tamaño de muestra

El cálculo para el tamaño de la muestra se realizó en el Software GraphPad StatMate v2.0 obteniendo un tamaño de muestra de 12 por grupo con una potencia del estudio al 80%, con una desviación estándar esperada por grupo de 0.5 a dos colas de significancia, con un intervalo de confianza al 95%.

5.2.2 Grupos de estudio

Tabla 1 Grupos de estudio

GRUPO	SOLUCIONES
I	Hipoclorito 2.25%+ Sol. Salina+ EDTA
II	Solución Enzimática + Solución Hiperosmótica
III	Solución Salina

5.3 Criterios de selección de las muestras

5.3.1 Criterios de inclusión

- Raíces distales de primeros y segundos molares inferiores, raíces palatinas de primeros y segundos molares superiores.
- Dientes con conductos permeables.
- Raíces con curvaturas no mayor a 20°, determinadas por el método de Schenider.
- Raíces completas, de 12 a 14 mm.

5.3.2 Criterios de exclusión

- Dientes calcificados.
- Dientes con ápice abierto
- Raíces con curvaturas mayores a 20°.
- Raíces incompletas
- Raíces con caries radicular
- Raíces menores de 12 mm.

5.3.3 Criterios de eliminación

- Conductos con instrumentos separados
- Conductos transportados o perforados
- Dientes con fractura radicular
- Contaminación con cepas bacterianas diferentes de las incluidas en el estudio.

5.4 Definición conceptual y operacional de las variables

5.4.1 Variables independientes

Variable	Clasificación	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala
Protocolo de irrigación	Categórica nominal	Secuencia detallada de un proceso de actuación científica, médica o técnica.	Irrigación con aguja de salida lateral y jeringa que es utilizada para transportar las soluciones dentro del conducto radicular.	Protocolo A (Irrigación con las soluciones que se emplean en la clínica de la maestría: NaClO 2.25%, solución salina, EDTA) Protocolo B (irrigación: Solución enzimática/Solución hiperosmótica)

5.4.2 Variables dependientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Desinfección	Erradicar o eliminar bacterias en su totalidad en alguna zona en específico.	Remoción del biofilm bacteriano por medio de 2 protocolos diferentes de irrigación en conjunto con la acción mecánica de los instrumentos endodónticos. Evaluando su remoción mediante toma de muestra y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)	Conteo de UFC
Disgregación de biofilm	Destrucción de la matriz extracelular compuesta de polisacáridos. Consiste en la separación de las células bacterianas y su dispersión, lo que reduce la cohesión y la estabilidad de la biopelícula. Puede ser inducido por factores mecánicos, químicos o biológicos	Descomposición de la matriz extracelular por medio de una solución enzimática a base de celulasa que permita desintegrar los compuestos de la matriz extracelular para descubrir los microorganismos inmersos en el biofilm. Posterior a eso, se irriga con solución hiperosmótica.	Escala de Rome

5.5 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism v5.0. Se analizó la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov Smirnov. Debido a que los datos no demostraron una distribución normal, se realizó la prueba no paramétrica Kruskall Wallis.

Para las comparaciones múltiples de los grupos se utilizó la prueba Test de Dunn.

5.6 Consideraciones éticas

a) Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología (CEI) UASLP, con la clave **CONBIOÉTICA-24-CEI-001-20190213**

b) Grado de riesgo del estudio:

Investigación con riesgo mínimo debido que este fue un estudio *in vitro* que se realizó en dientes extraídos. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos generados fueron manejados y dispuestos según lo que indica el reglamento que rige el laboratorio de la institución, el cual está basado en la Norma Oficial Mexicana **NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.** (23)

La Norma Oficial Mexicana establece la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, así como las especificaciones para su manejo.

c) Compromiso de aplicación de las normas internacionales a los procedimientos clínicos y de laboratorio

Durante este proyecto de investigación la alumna de la maestría en endodoncia UASLP con el número de identificación 350920 respetó y llevó a cabo lo establecido con las normas de salud durante todo el proyecto.

d) NOM que apliquen para los procedimientos

- NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo.(24)

5.7 Metodología experimental

La etapa experimental se dividió en las siguientes fases:

1. Fase de preparación de las muestras.
2. Formación de biofilm mixto de *E. Faecalis* y *C. Albicans* por método estático.
3. Elaboración de las soluciones irrigantes.
4. Instrumentación: utilizando las soluciones a probar.
5. Evaluación mediante conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)
6. Evaluación en Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

5.7.1 Fase de preparación de las muestras

- ✓ Se recolectaron 36 dientes humanos en diferentes clínicas de la facultad de estomatología, centros de salud y hospitales públicos con previo consentimiento autorizado. Se seleccionaron las raíces distales de molares superiores y palatinas de molares inferiores con longitud de 12 a 14 mm y una curvatura máxima de 20°.
- ✓ Se tomaron radiografías preoperatorias en dirección buco-lingual y mesio-distal para confirmar la presencia de un solo conducto, libre de obturaciones y una curvatura menor de 20° medida con el método Schneider.

- ✓ Se utilizó una pieza de mano (Pieza De Mano Alta velocidad NSK Panamax 2) para decoronar y seccionar las muestras a nivel de la unión cementoesmalte se utilizó un disco de diamante para lograr obtener una longitud estándar de 12 a 14 mm.
- ✓ Posteriormente, se patentizó el conducto con limas K de 10 a 25 (Dentsply Sirona, York, PA, EE. UU.) para permeabilizar el conducto, permitir el flujo del medio y así permitir el crecimiento de los microorganismos dentro del conducto radicular.
- ✓ Para la limpieza y desinfección, se llevó a cabo el protocolo de Haapasalo, el cual consiste en colocar las piezas seccionadas en baño ultrasónico de las siguientes soluciones: hipoclorito de sodio (NaClO) al 5.25% durante 4 minutos, seguido por 4 minutos con agua destilada, posteriormente 4 minutos con EDTA 17%, finalmente se realizaron los baños con agua destilada que fueran necesarios hasta verificar que el agua estuviera limpia.
- ✓ Las piezas se colocaron en bolsas para esterilización en 3 grupos de 12 cada uno y se esterilizaron en autoclave de vapor a 121ºC por 20 minutos. (5)

5.7.2 Formación de biofilm mixto de *E. Faecalis* y *C. Albicans* por método estático

- Reactivación de la cepa e identificación morfológica
- Preparación de los medios de cultivo mixtos
- Desarrollo del biofilm
- Reactivación de la cepa e identificación morfológica

Los microorganismos utilizados fueron obtenidos del cepario de la Maestría en Endodoncia los cuales fueron aislados de pacientes con periodontitis apical previamente identificados por pruebas enzimáticas (Api 20 Strep y Api 20 Aux).

E. faecalis se reactivó en caldo de infusión cerebro corazón (BHI) y *Candida albicans* en caldo de Dextrosa Sabouraud respectivamente durante 24 y 48 horas

respectivamente. Posterior a esto se sembraron en placas de agar en sus respectivos medios para la siguiente etapa, la cual es la combinación de ambas cepas. Una vez obtenido el desarrollo de los microorganismos se comprobó su pureza por medio de tinción de Gram y se observó su morfología microscópica (Leica, Alemania) a 100X.

- **Preparación de los medios de cultivo**

La preparación de los medios de cultivo está basada en lo reportado en el artículo de Casillas Contreras “Elimination of *E. faecalis* and *C. albicans* Biofilm: A Comparison Between Single and Multiple File Systems in an Ex Vivo Study” donde se recomienda una mezcla de Dextrosa Sabouraud y de BHI en una proporción de 25%/75% respectivamente. (25)

- **Desarrollo del biofilm**

Bajo un ambiente estéril dentro de la campana de flujo laminar (LABCONCO, EUA) en tubos de 200 mm x 15 cm con 15 mL de medio de cultivo mixto estéril se realizó el inóculo con 100 µL de cada una de las cepas a una escala de Mc Farland de 0.5, posteriormente se colocaron las muestras por grupo en sus tubos correspondientes. Se incubaron en la estufa bacteriológica a 35+/-2 C° por 48 horas. (Imagen 2)

Se realizaron recambios del medio de cultivo por uno fresco cada 48 horas de todos los grupos, así durante 28 días. En cada recambio se realizó una tinción de Gram y se observó al microscopio óptico para verificar la pureza de los

microorganismos y descartar alguna contaminación con alguna cepa no deseada. (imagen 3)

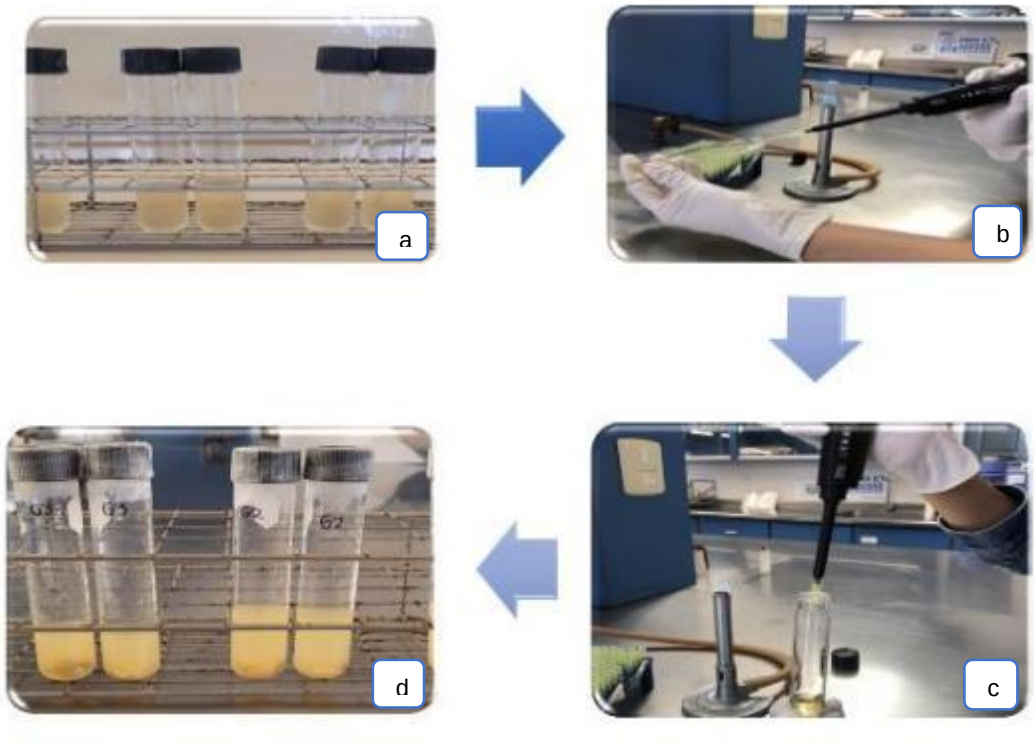


Imagen 2 Inoculación para la formación de biofilm mixto. a) Medio de cultivo para la formación de biofilm. b) Toma del inóculo. c) Siembra del inóculo en los tubos. d) Desarrollo a las 24 horas.

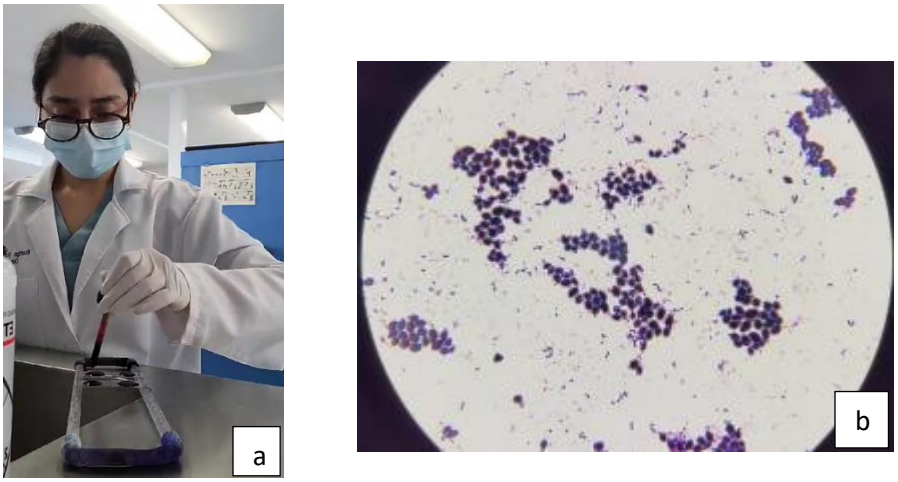


Imagen 3 a) Tinción de Gram (b Vista microscópica de *C. albicans* y *E. Faecalis*

5.7.3 Elaboración de las soluciones irrigantes

La solución enzimática se elaboró a partir de la enzima celulasa comercial proveniente de *Trichoderma reesei* (Novozyme 1.5L) la cual fue purificada a través de membranas de diálisis (12-14 kDa) en agua desionizada por 4 días a 4 °C

La solución hiperosmótica a probar se elaboró con base a la propuesta de la Dra. Mónica Rojas en el artículo titulado “Efecto antibacteriano de una solución hiperosmótica a base de sorbato y etanol sobre *Enterococcus faecalis* en forma planctónica y como biofilm.” (26) Se describe en el anexo 1.

5.7.4 Instrumentación: utilizando las soluciones a probar

Instrumentación e irrigación de las muestras

Las muestras fueron un total de 36 raíces. Estas se dividieron en 3 grupos (n=12) aleatoriamente:

- Grupo I: NaClO 2.25% + Sol. Salina + EDTA+ Sol. Salina
- Grupo II: Solución Enzimática y Solución Hiperosmótica
- Grupo III: Solución Salina (control positivo)

1. Se colocaron las muestras en un adaptador que se emplea para fijar las raíces en godetes para poderlos aislar e instrumentar simulando la situación clínica. (Imagen 5-A)
2. Se aisló la raíz a trabajar con grapa y dique de hule. (Imagen 5-B)
3. Se realizó la desinfección del campo operatorio con una torunda de algodón embebida de las siguientes soluciones: peróxido de hidrógeno al 30% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 5.25% por 1 minuto y posterior a esto se desactivaron las soluciones con tiosulfato de sodio al 10%. (Imagen 5-C)
4. Se realizó una toma de muestra del campo operatorio para comprobar su desinfección.

5. Se tomaron muestras preoperatorias intraconducto. Se colocó una gota del medio de cultivo en la entrada del conducto y se introdujeron en total 3 puntas de papel calibre 30 durante 1 minuto cada una. Después se transfirieron a un tubo de cultivo mixto. (Imagen 6-A)
6. Se instrumentó el conducto con limas Fanta AF Blue S-One (Fanta Dental Materials) hasta la lima 25/06 siguiendo la secuencia del fabricante (27) (Imagen 6-B) y se irrigó con una jeringa de 5 mL de la siguiente manera:

Tabla 2 Soluciones irrigantes en etapa experimental

	Irrigación entre cada instrumento	Irrigación final
GRUPO 1 NaClO 2.25%	2 mL NaClO 2.25%	2 mL Sol. Salina + EDTA 17% (1 minuto) +2 mL sol. salina
GRUPO 2 Solución enzimática + solución hiperosmótica	2 mL Solución Salina entre cada instrumento	5 mL Solución Enzimática (2 min) +2 mL Solución Salina +5 mL Solución Hiperosmótica (2 min) +2 mL Sol. Salina
GRUPO CONTROL Solución salina	2 mL Solución Salina	2 mL Solución Salina

5.7.5 Evaluación mediante conteo de UFC

1. Después de la instrumentación, se realizó la segunda toma de muestra (post operatoria) introduciendo 3 puntas de papel calibre #35 por 1 minuto cada una después se transfirieron a un tubo de cultivo mixto. (Imagen 6-C)
2. Se colocaron los tubos con las muestras en la estufa bacteriológica a 35+/-2°C por 24 horas
3. A las 24 horas se realizó una medición en el densitómetro para medir la turbidez en escala de McFarland de cada uno de los tubos.
4. Posteriormente se realizaron las diluciones seriadas (10^{-n}) para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) posterior a una incubación a 35+/-2°C de 24 horas. (Imagen 4)

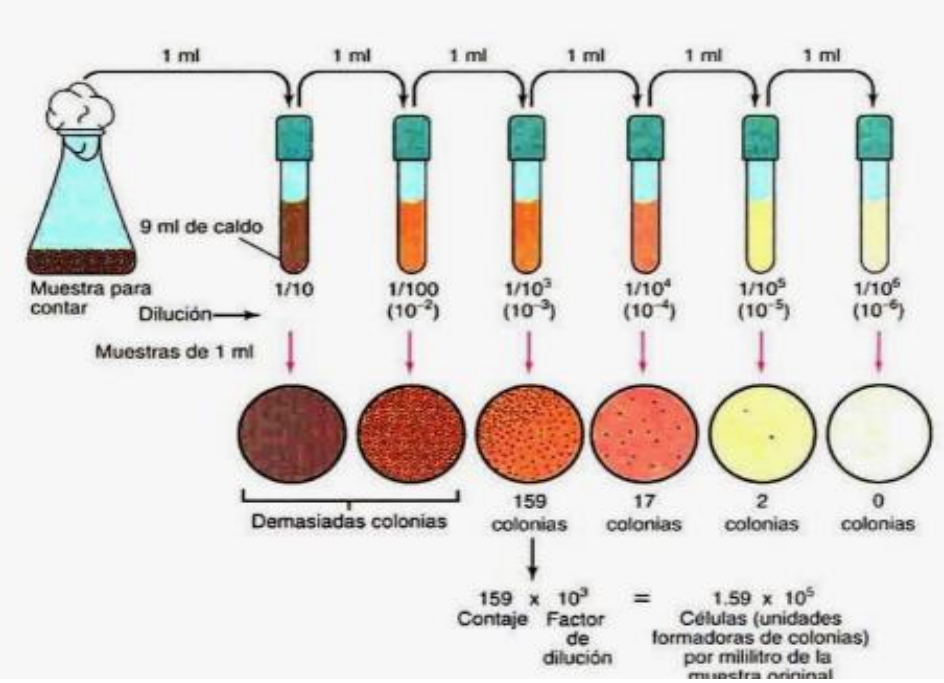


Imagen 4 Seguimiento de la carga inicial y final de las muestras para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)

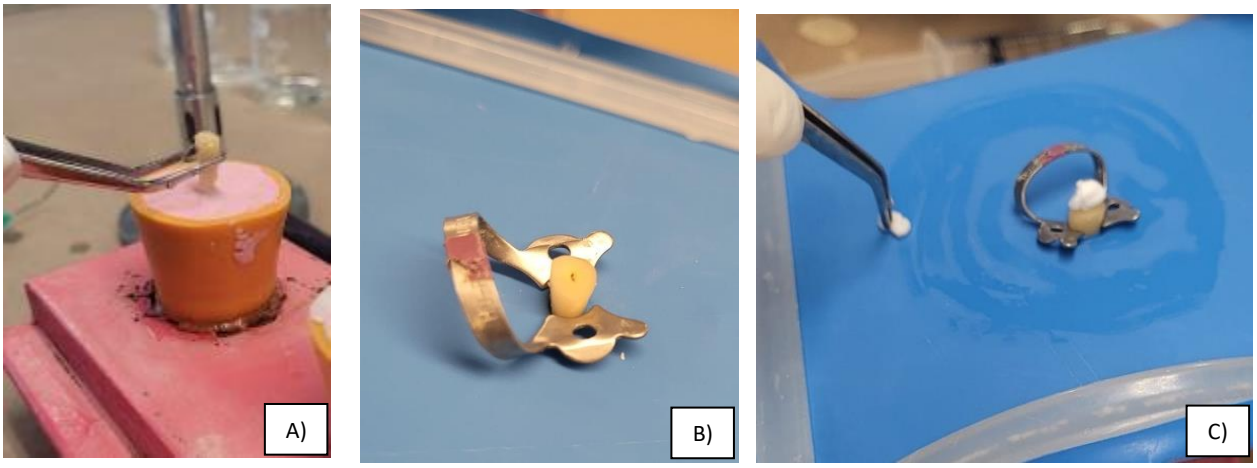


Imagen 5 A) Colocación de la muestra en adaptador. B) aislamiento de la muestra. C) Desinfección del campo operatorio.

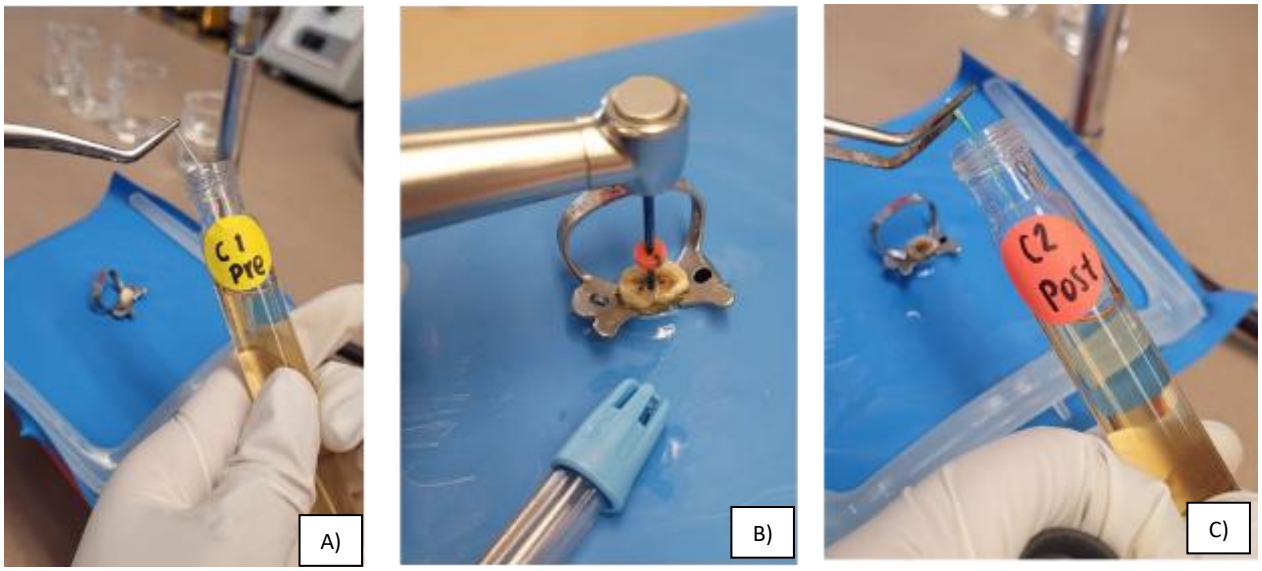


Imagen 6 A) Toma de muestra preoperatoria. B) Instrumentación. C) Toma de muestra postoperatoria

5.7.6 Evaluación en Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

Se realizó una selección aleatoria de 4 muestras por grupo y se procesaron de la siguiente manera: método para lectura al MEB de muestras biológicas

1. Se cortaron longitudinalmente con fresas de punta de lápiz de diamante y se separaron mediante cincel y martillo dando un golpe seco (Imagen 7). Se Observaron bajo el microscopio estereoscópico. (Imagen 8)

2. **Fijación de muestras**
   Las muestras se fijaron colocándose en glutaraldehído al 2% (SIGMA-ALDRICH) en azul de alciano (Alcian blue, GX SIGMA-ALDRICH) al 1% y se colocaron en refrigeración por 24 horas.

3. **Deshidratación de las muestras**
   Las muestras se deshidrataron mediante alcoholes crecientes al 20, 40, 60, 80, 90 y 95% durante 10 minutos en cada uno de ellos (Imagen 9) para finalmente ser almacenadas en alcohol al 99% hasta ser llevadas al proceso de secado de punto crítico.

4. **Punto crítico**
   Las muestras se sometieron recambios de punto crítico de CO_2 (Critical Point Dryer 020 Balzers Union) y al finalizar, estas fueron guardadas en tubos Eppendorf y se colocaron en un desecador al vacío con sílica para mantenerlas en un espacio libre de humedad hasta ser procesadas en el MEB.

5. **Recubrimiento de oro**

   Se obtuvieron las muestras del desecador y de los tubos Eppendorf y se pegaron con cinta de carbón en los aditamentos de lectura del MEB. Se les realizó un baño de oro en el dispositivo recubridor de oro (Ion Sputter 9JEOL JFC-1100) (Imagen 10)



Imagen 7 Sección de raíces

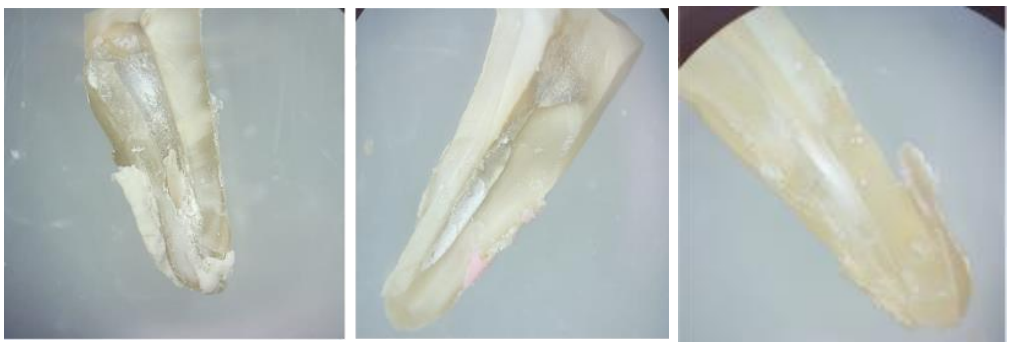


Imagen 8 Raíces seccionadas observadas bajo el microscopio estereoscópico



Imagen 9 Deshidratación de las muestras con alcoholes crecientes



Imagen 10 Baño de oro de las muestras

6 RESULTADOS

El análisis de los resultados se realizó en el siguiente orden:

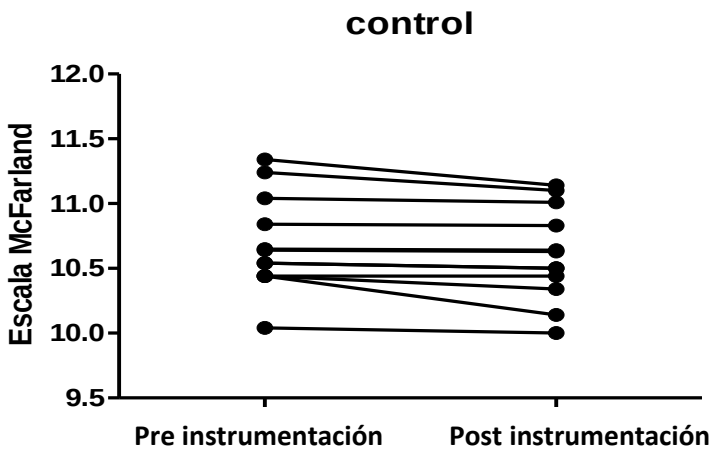
1. Medición de la turbidez de las muestras con escala de McFarland de los 3 grupos pre y post instrumentación.
2. Capacidad antimicrobiana de los 3 protocolos de irrigación, en un biofilm mixto por medio del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) pre y post instrumentación
3. Observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido del tercio apical de las raíces instrumentadas e irrigadas. Las imágenes fueron evaluadas por 2 observadores externos según la siguiente escala de Rome modificada (22)

ESCALA DE ROME	
0	0% presencia de microorganismos
1	25% presencia de microorganismos
2	50% presencia de microorganismos
3	75% presencia de microorganismos
4	100% presencia de microorganismos

6.1 Medición de la turbidez de las muestras con escala de McFarland

GRUPO CONTROL

# MUESTRA	PRE	POST
1	10.44	10.34
2	10.44	10.14
3	11.04	11.01
4	10.84	10.83
5	10.64	10.63
6	10.04	10.00
7	10.54	10.50
8	10.54	10.50
9	11.24	11.10
10	10.65	10.64
11	11.34	11.14
12	10.44	10.44

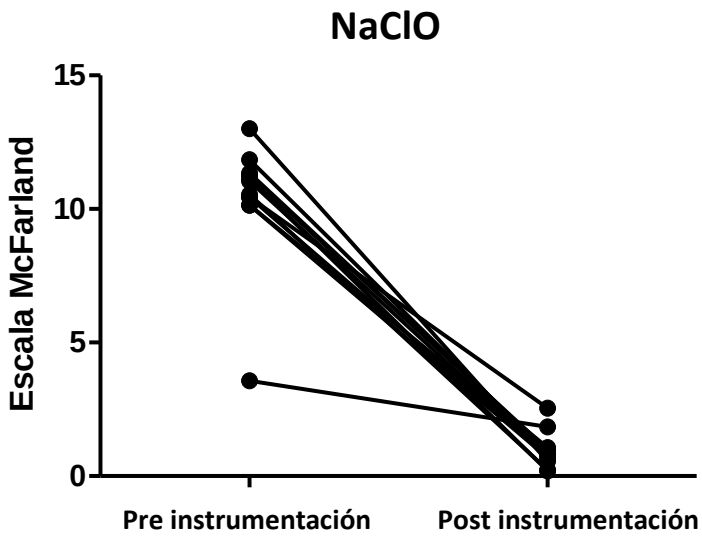


Minimum	10,04	10,00
25% Percentile	10,44	10,37
Median	10,59	10,57
75% Percentile	10,99	10,97
Maximum	11,34	11,14
Mean	10,68	10,61
Std. Deviation	0,3728	0,3630
Std. Error	0,1076	0,1048

Mann Whitney test	
P value	0,5824

GRUPO HIPOCLORITO DE SODIO (NaClO)

# MUESTRA	PRE	POST
1	10.54	0.23
2	13.34	0.55
3	10.14	0.70
4	10.44	1.55
5	11.14	0.19
6	11.84	0.85
7	11.04	0.81
8	11.34	0.96
9	11.24	0.99
10	11.57	1.84
11	10.14	1.07
12	10.44	0.80

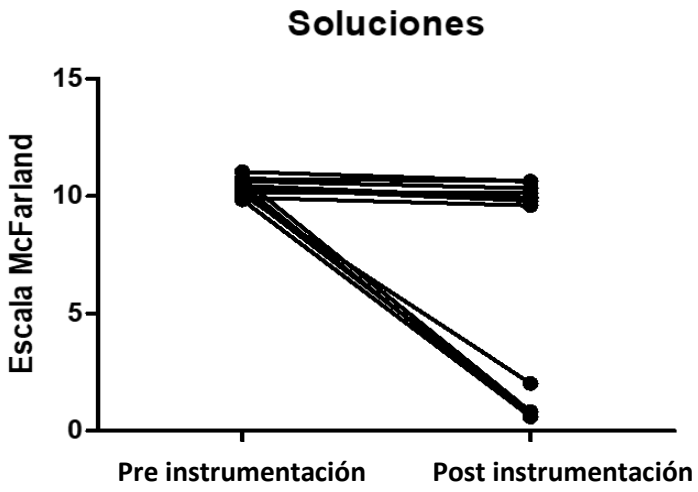


Minimum	3,570	0,1900
25% Percentile	10,22	0,5875
Median	10,79	0,8300
75% Percentile	11,32	1,050
Maximum	13,00	2,550
Mean	10,41	0,9617
Std. Deviation	2,300	0,6562
Std. Error	0,6639	0,1894

Mann Whitney test	
P value	< 0.0001

GRUPO SOLUCIONES ENZIMÁTICA + HIPEROSMÓTICA

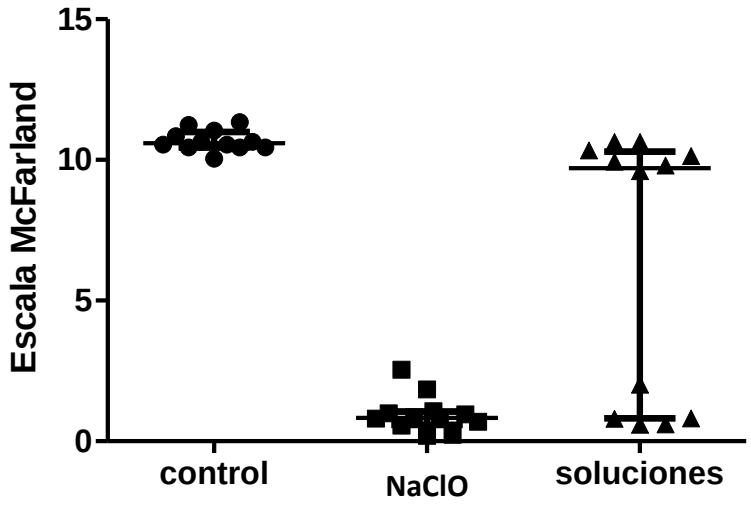
# MUESTRA	PRE	POST
1	10.34	9.81
2	10.44	0.59
3	9.84	0.60
4	10.64	10.34
5	10.18	9.80
6	10.44	9.94
7	10.74	0.82
8	10.74	10.64
9	9.94	9.61
10	10.07	2.02
11	11.04	10.64
12	10.14	9.14



Minimum	9,840	0,5900
25% Percentile	10,09	0,8125
Median	10,39	9,710
75% Percentile	10,72	10,29
Maximum	11,04	10,64
Mean	10,38	6,330
Std. Deviation	0,3631	4,756
Std. Error	0,1048	1,373

Mann Whitney test	
P value	0,0109

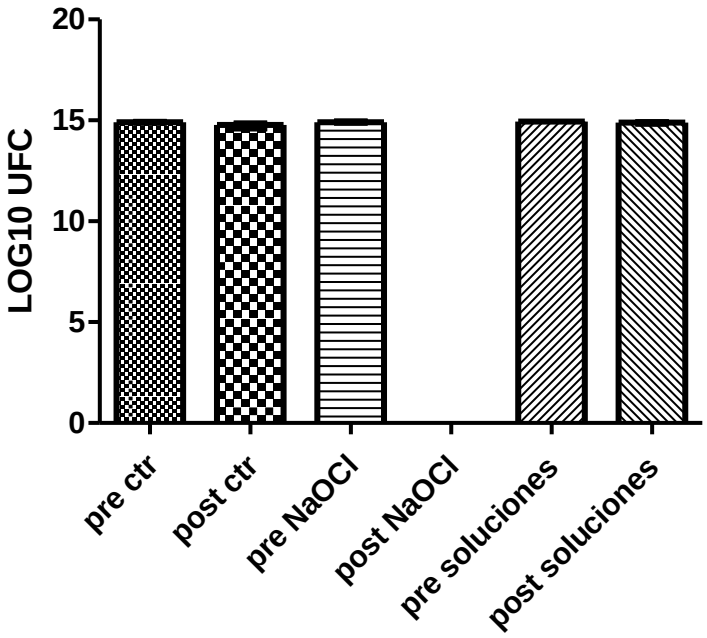
POST INSTRUMENTACIÓN



Minimum	10,04	0,1900	0,5900
25% Percentile	10,44	0,5875	0,8125
Median	10,59	0,8300	9,710
75% Percentile	10,99	1,050	10,29
Maximum	11,34	2,550	10,64
Mean	10,68	0,9617	6,330
Std. Deviation	0,3728	0,6562	4,756
Std. Error	0,1076	0,1894	1,373

Kruskal-Wallis test	
P value	< 0.0001

6.2 Capacidad antimicrobiana por medio del conteo de UFC pre y post instrumentación



Control	
Pre log10	Post log10
14.89	14.61
14.92	14.84
14.90	14.61
14.92	14.84
14.91	14.78
14.90	14.86
14.89	14.78
14.92	14.61
14.94	14.84
14.93	14.78
14.92	14.86
14.91	14.61

Hipoclorito de Sodio	
Pre log10	Post log10
14.88	0.00
14.90	0.00
14.89	0.00
14.90	0.00
14.91	0.00
14.91	0.00
14.93	0.00
14.93	0.00
14.95	0.00
14.94	0.00
14.94	0.00
14.94	0.00

Soluciones a probar	
Pre log10	Post log10
14.94	14.91
14.93	14.84
14.94	14.82
14.94	14.89
14.94	14.92
14.94	14.88
14.94	14.91
14.94	14.84
14.94	14.82
14.94	14.89
14.94	14.92
14.94	14.91

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Number of values	12	12	12	12	12	12
Minimum	14,89	14,61	14,88	0,0	14,93	14,82
25% Percentile	14,90	14,61	14,90	0,0	14,94	14,84
Median	14,92	14,78	14,91	0,0	14,94	14,89
75% Percentile	14,92	14,84	14,94	0,0	14,94	14,91
Maximum	14,94	14,86	14,95	0,0	14,94	14,92
Mean	14,91	14,75	14,92	0,0	14,94	14,88
Std. Deviation	0,01545	0,1085	0,02236	0,0	0,002887	0,03872
Std. Error	0,004459	0,03133	0,006455	0,0	0,0008333	0,01118
Lower 95% CI of mean	14,90	14,68	14,90	0,0000e+000	14,94	14,85
Upper 95% CI of mean	14,92	14,82	14,93	0,0000e+000	14,94	14,90
KS normality test						
KS distance	0,1863	0,2696	0,1718		0,5303	0,2037
P value	> 0.10	0,0161	> 0.10		< 0.0001	> 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	Yes		No	Yes
P value summary	ns	*	ns		***	ns

PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA

Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	59,62		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
pre ctr vs post ctr	26,08	Yes	*
pre ctr vs pre NaOCl	-2,042	No	ns
pre ctr vs post NaOCl	39,50	Yes	***
pre ctr vs pre soluciones	-17,75	No	ns
pre ctr vs post soluciones	11,21	No	ns
post ctr vs pre NaOCl	-28,13	Yes	*
post ctr vs post NaOCl	13,42	No	ns
post ctr vs pre soluciones	-43,83	Yes	***
post ctr vs post soluciones	-14,88	No	ns
pre NaOCl vs post NaOCl	41,54	Yes	***
pre NaOCl vs pre soluciones	-15,71	No	ns
pre NaOCl vs post soluciones	13,25	No	ns
post NaOCl vs pre soluciones	-57,25	Yes	***
post NaOCl vs post soluciones	-28,29	Yes	*
pre soluciones vs post soluciones	28,96	Yes	**

6.3 Observación de muestras en el MEB

FORMACIÓN DE BIOFILM 28 DÍAS

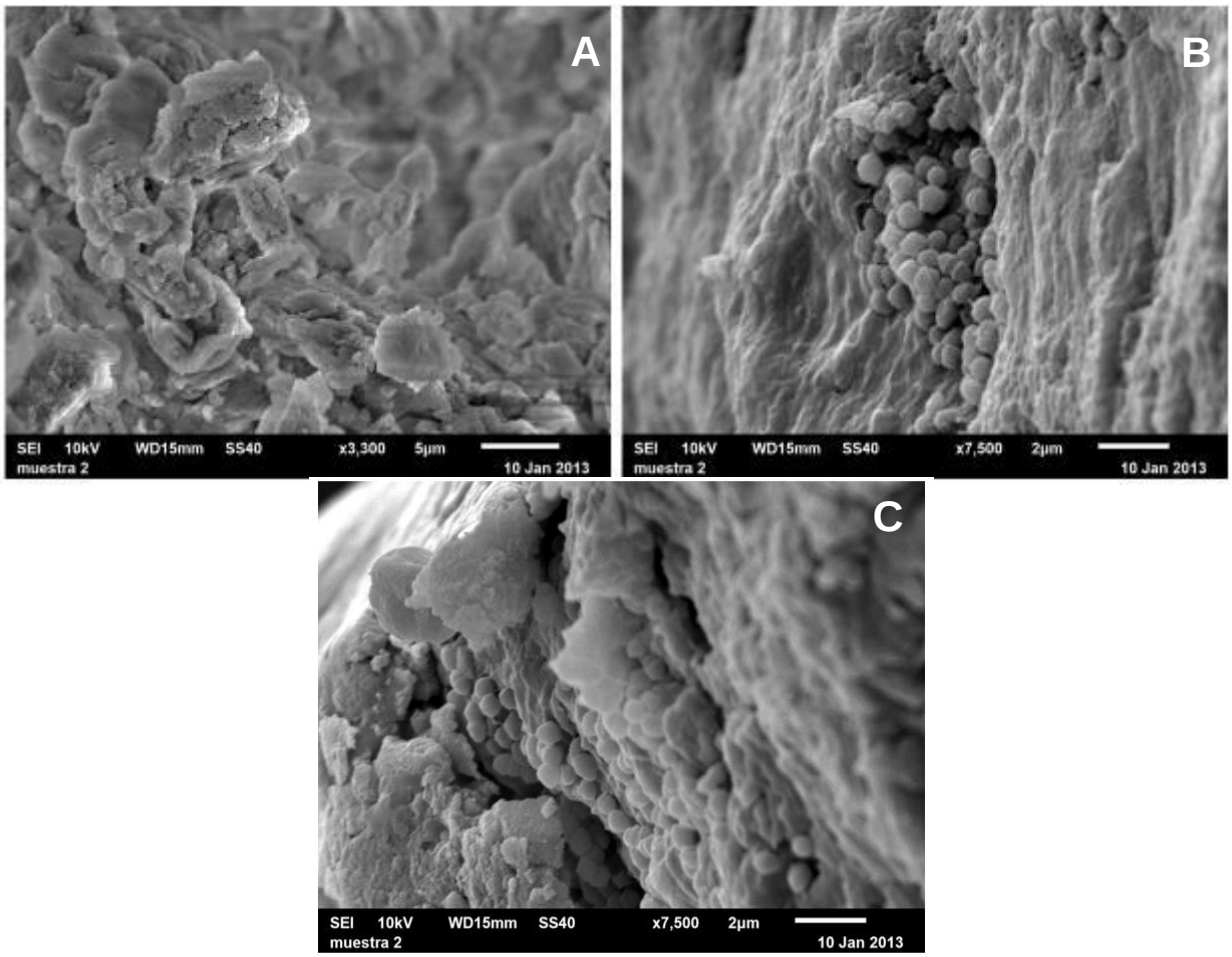


Imagen 11 A) Se observa un biofilm maduro donde las hifas de *C. Albicans* envuelven a *E. Faecalis* y se pueden distinguir claramente ambos microorganismos.

B Y C) Se observa un biofilm maduro con microorganismos con actividad metabólica. Con seguridad se observa el fenómeno de abrasión donde los microorganismos se desprenden del biofilm para poblar otras zonas.

GRUPO CONTROL

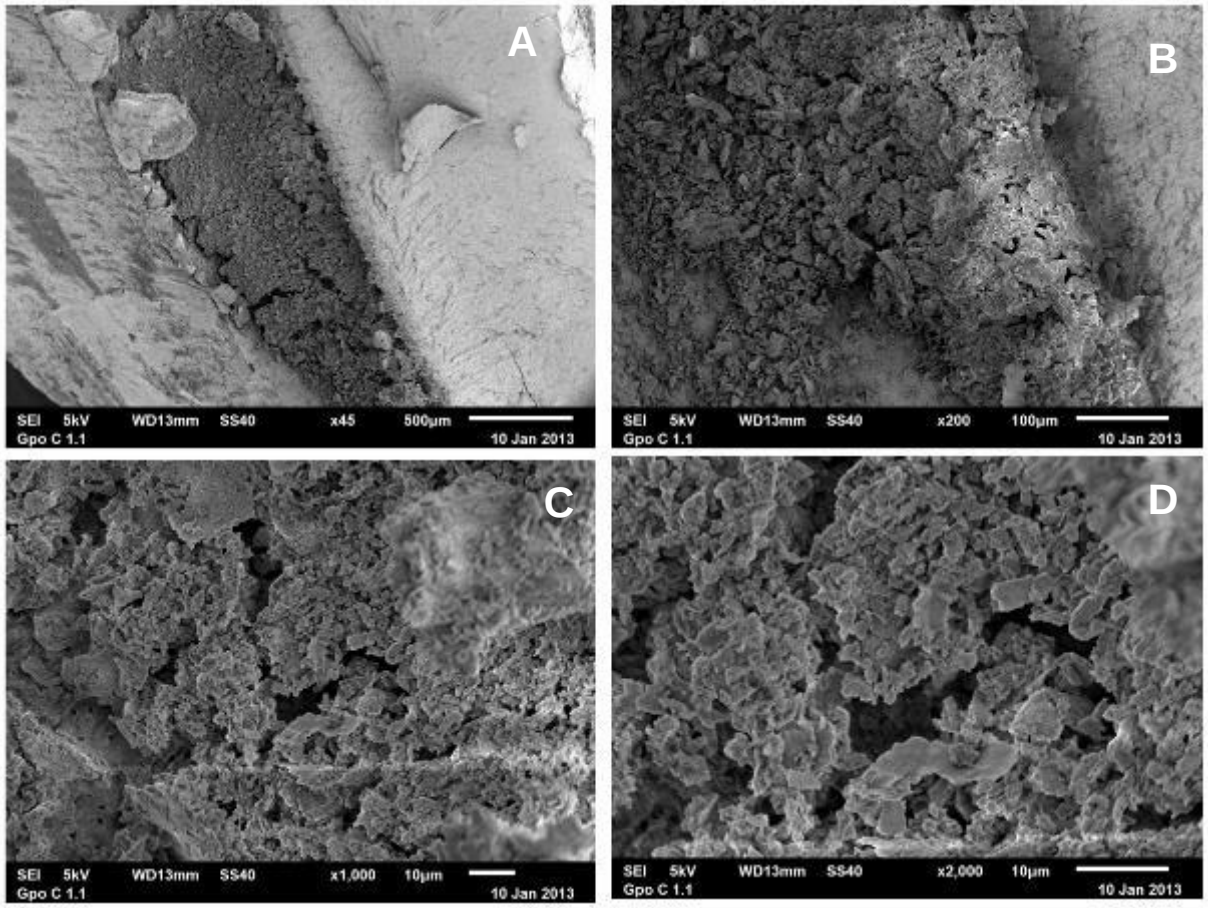


Imagen 102 A) Se observa una vista panorámica a x45 del conducto después de ser seccionada la raíz longitudinalmente B, C Y D) Se observa un biofilm desorganizado dejando expuestos algunos microorganismos después de la instrumentación mecánica e irrigación con Solución Salina las micrografías presentadas corresponden al tercio apical a a diferentes magnificaciones x200, x1000 y x2000.

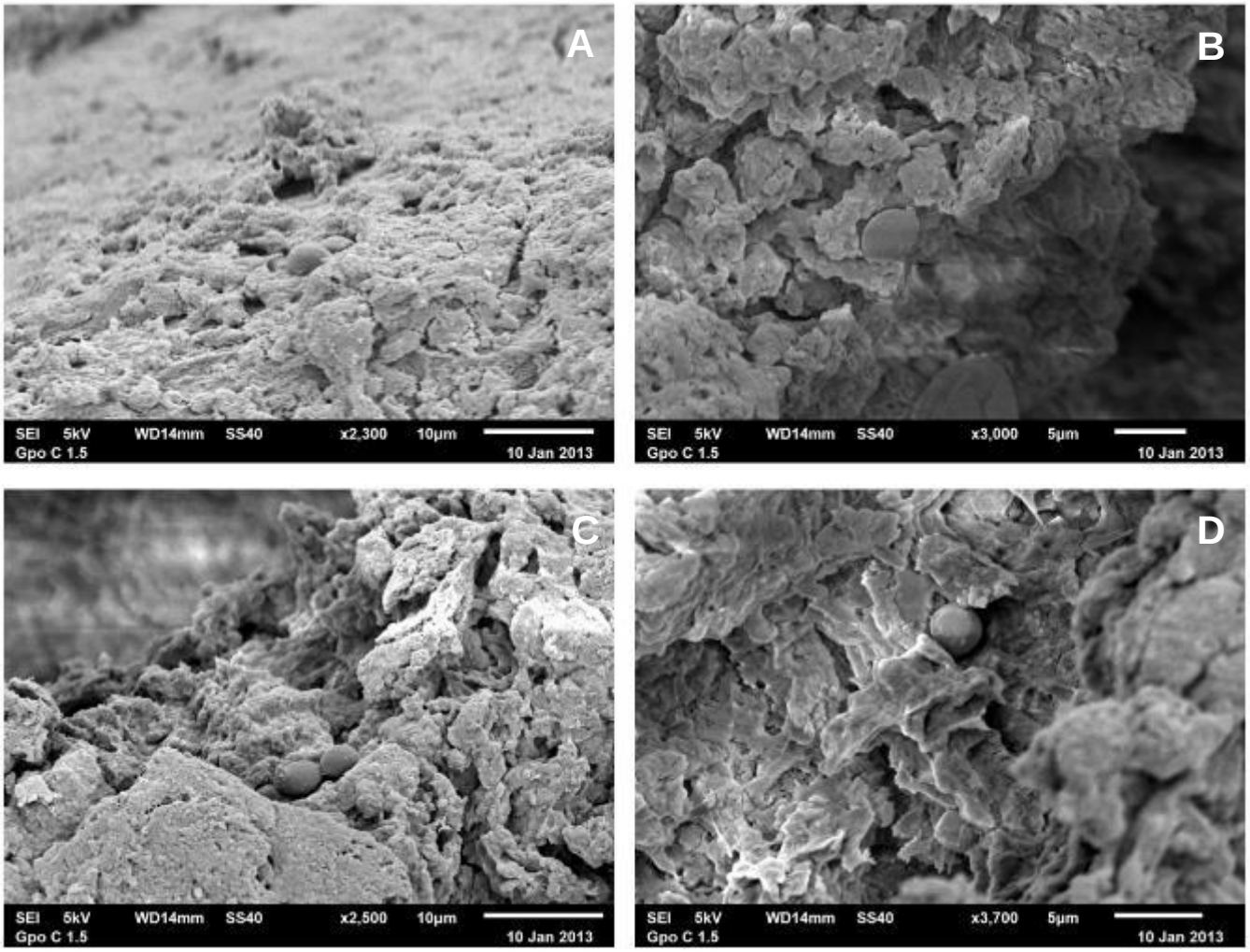


Imagen 13 A, B, C y D) Se observan microorganismos expuestos de un biofilm sólido después de la acción mecánica de la instrumentación e irrigación con Solución Salina

GRUPO HIPOCLORITO DE SODIO 2.25%

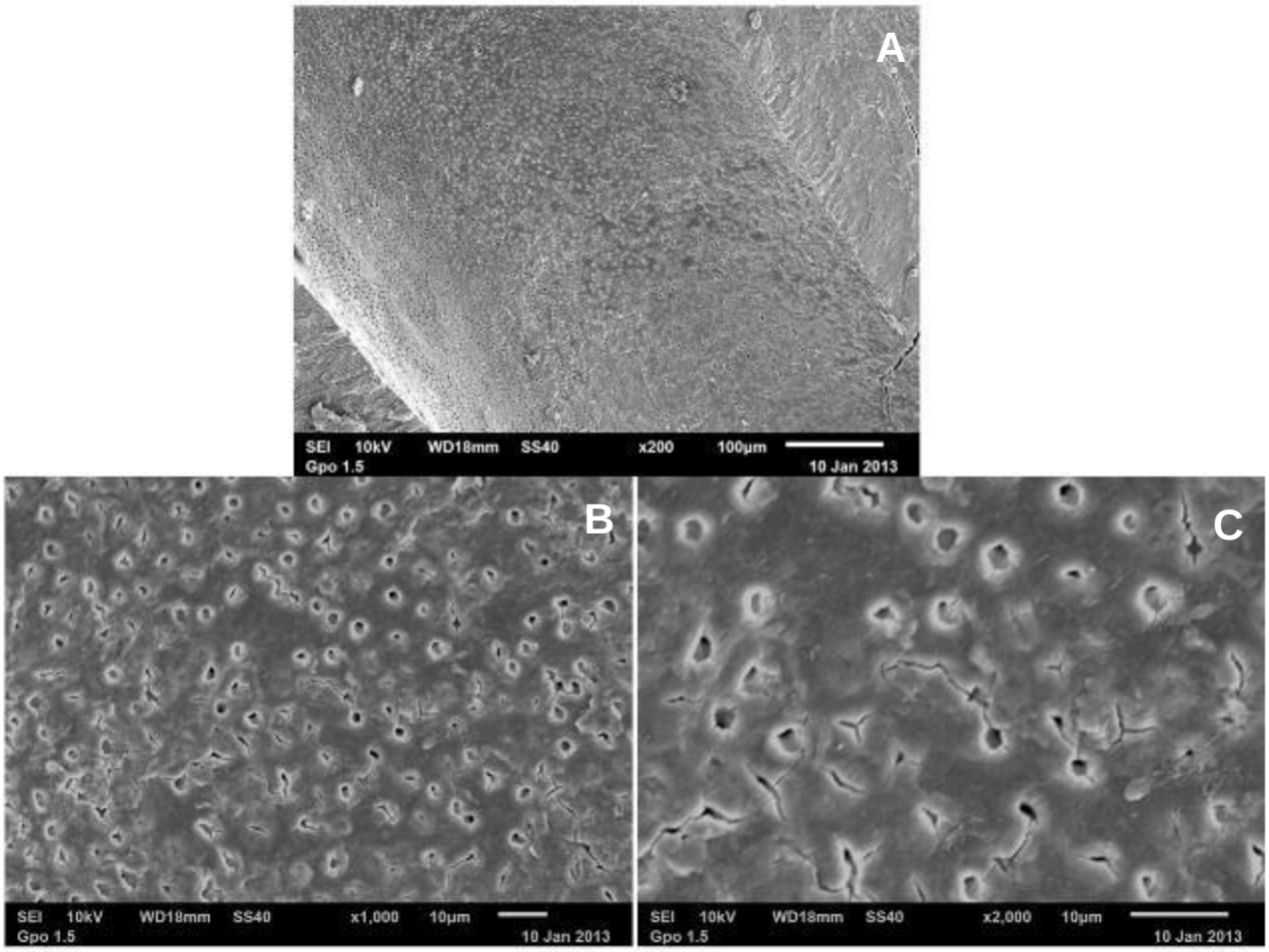


Imagen 14 Fotomicrografías correspondientes al grupo irrigado con NaClO al 2.25%. Se observan los tubulillos dentinarios gracias a la acción del irrigante. Si bien no se encuentran totalmente permeables, existe cierta apertura. A) Panorámica del conducto a una magnificación de x200 B) Tercio apical a una magnificación de x1000. C) Tercio apical una magnificación de x2000.

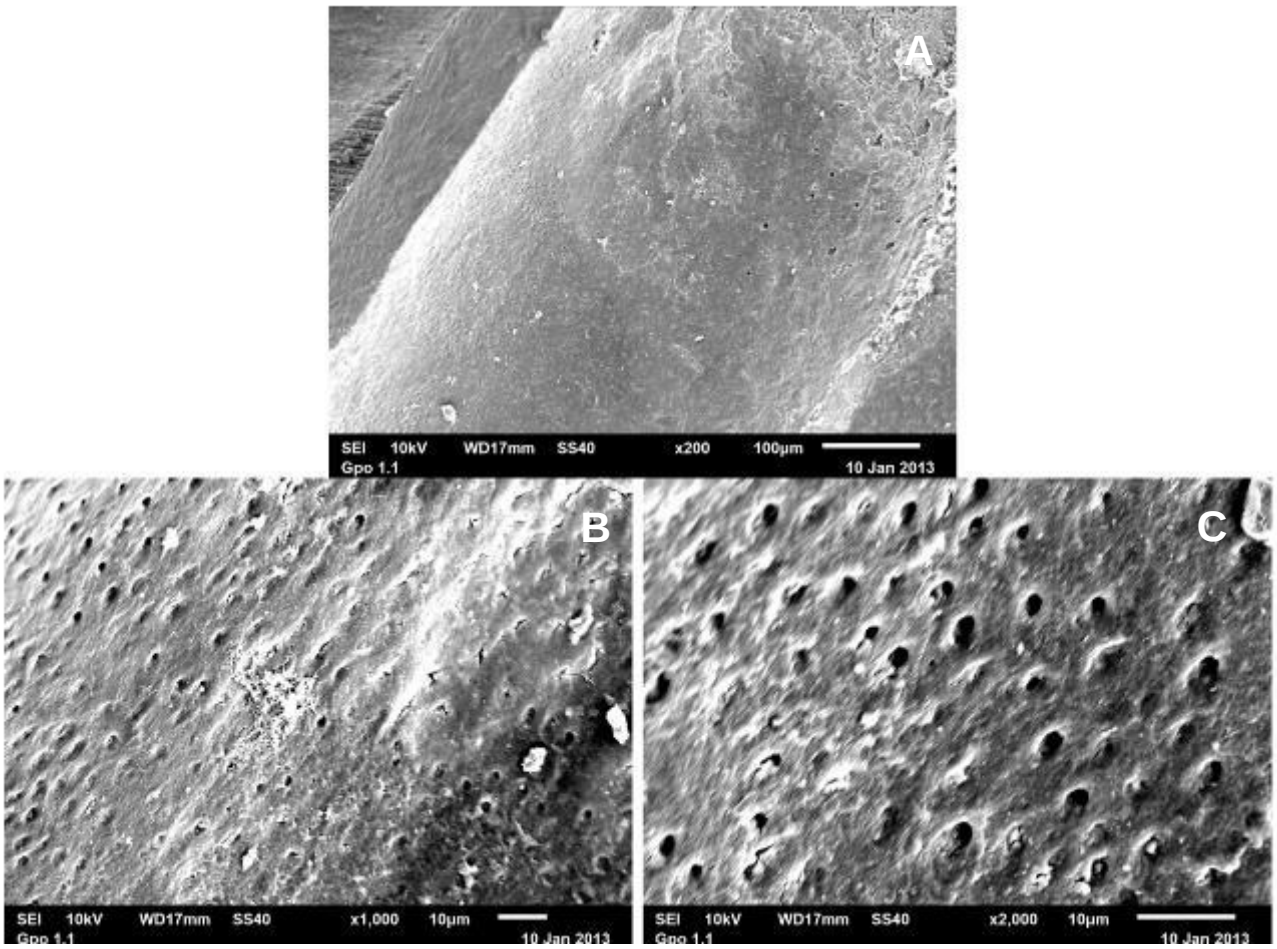


Imagen 15 Fotomicrografías correspondientes al grupo irrigado con NaClO al 2.25%. Se observan los tubulillos dentinarios gracias a la acción del irrigante. Si bien no se encuentran totalmente permeables, existe cierta apertura. A) Panorámica del conducto a una magnificación de x200 B) Tercio apical a una magnificación de x1000. C) Tercio apical una magnificación de x2000.

GRUPO SOLUCIONES A PROBAR: SOL. ENZIMÁTICA + SOL. HIPEROSMÓTICA

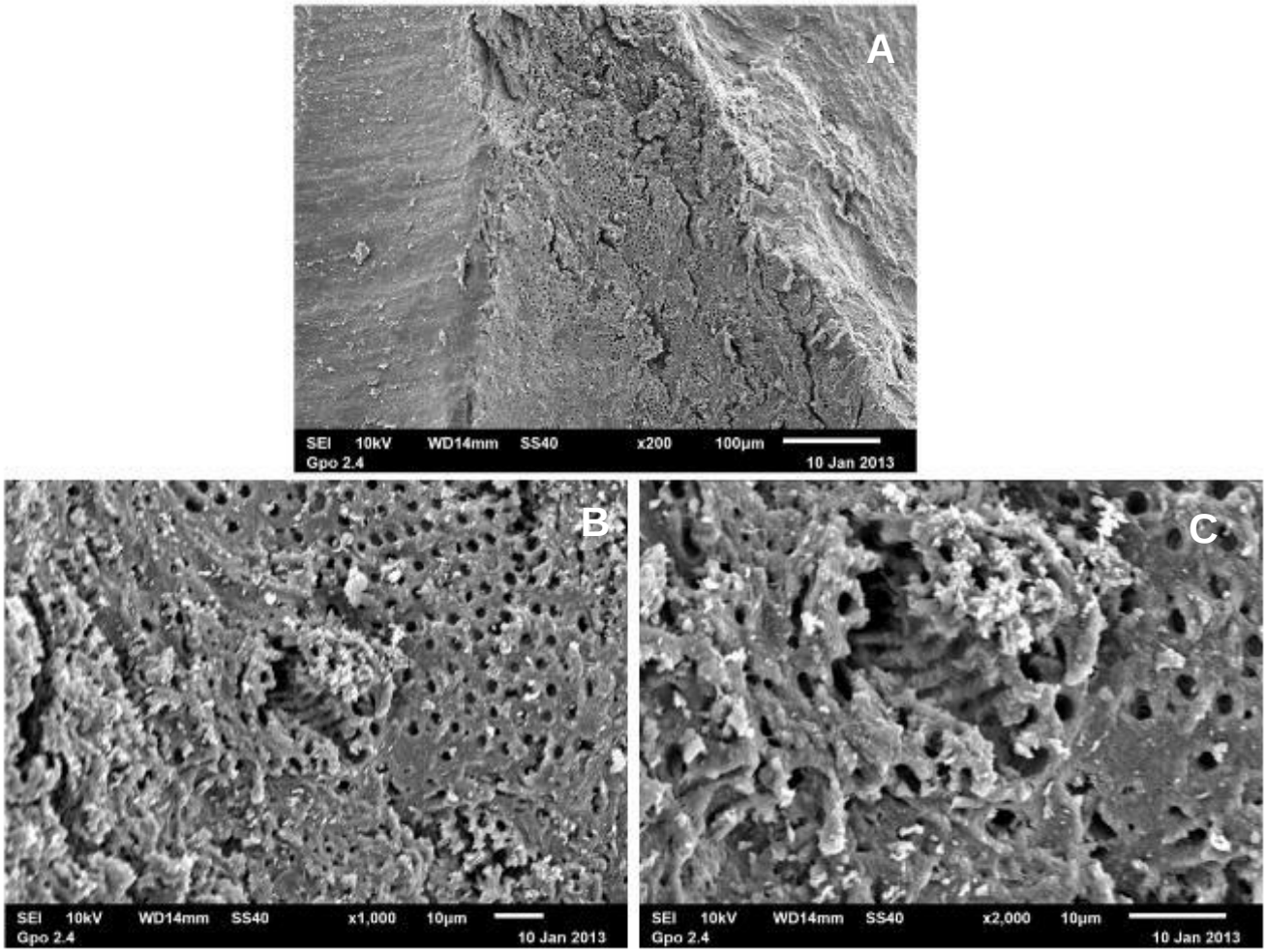


Imagen 16 En algunas zonas se observaron tubulillos expuestos; sin embargo, en algunos de los lugares observados se muestra la presencia en su mayoría cubierto por el biofilm formado. A) Panorámica del conducto a una magnificación de x200 B) Tercio apical a una magnificación de x1000. C) Tercio apical una magnificación de x2000.

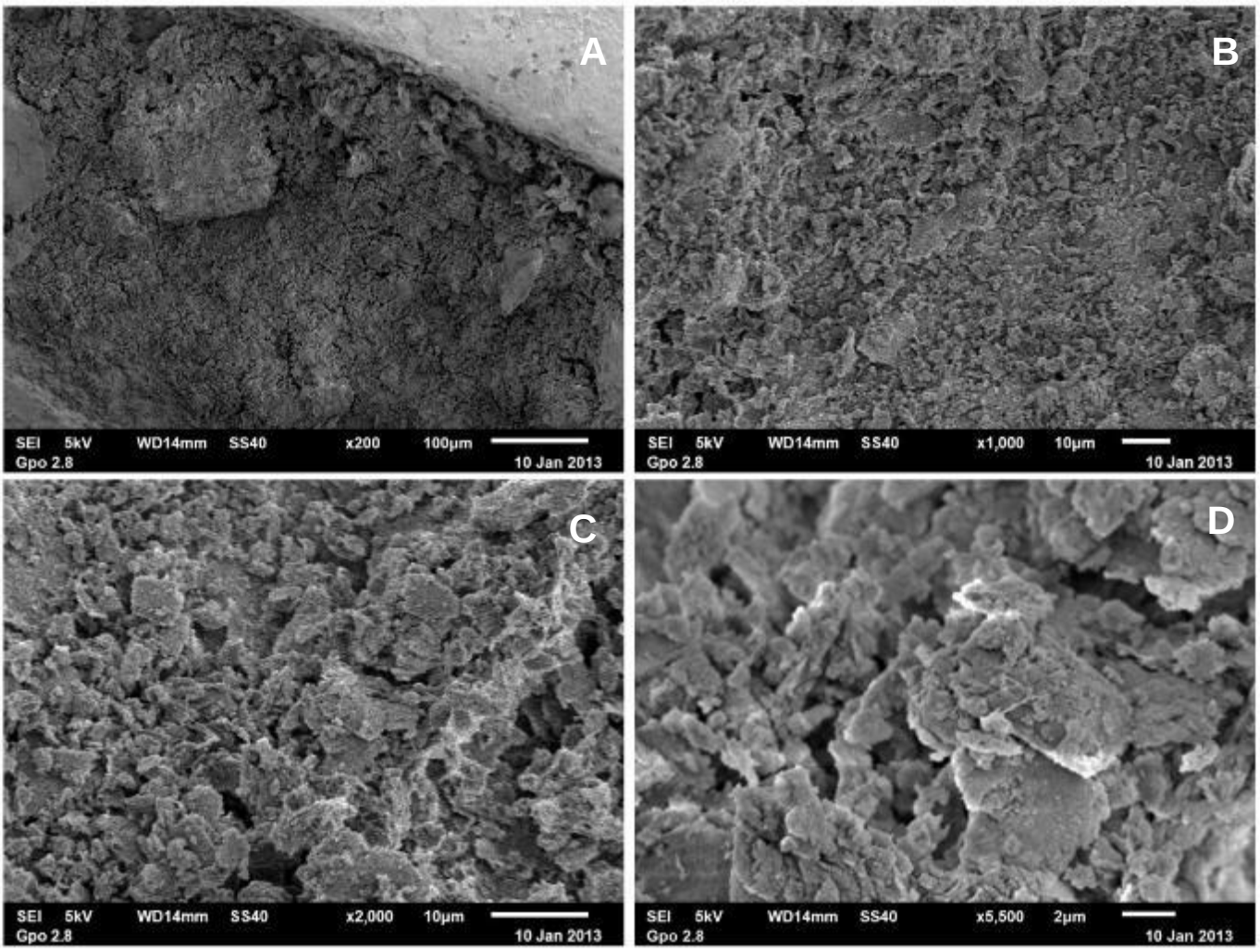


Imagen 17 Se muestra la presencia en su mayoría cubierto por el biofilm formado sin observarse los tubulillos dentinarios. A) Panorámica del conducto a una magnificación de x200 B) Tercio apical a una magnificación de x1000. C) Tercio apical una magnificación de x2000.

7 DISCUSIÓN

Una de las enfermedades inflamatorias más comunes que afectan a los humanos es la periodontitis apical, la cual tiene una etiología microbiana. Los microorganismos más prevalentes y dominantes asociados a la periodontitis apical son las bacterias, sin embargo, también se pueden encontrar hongos.(8)

El tratamiento endodóntico es una opción terapéutica en la cual se elimina el contenido infectado y/o inflamado del sistema de conductos radiculares para permitir la curación de una lesión periapical preexistente o para prevenir la infección de los tejidos periradiculares. La preparación quimiomecánica tiene como objetivo eliminar el tejido pulpar, ya sea inflamado o necrótico/infectado, creando un espacio dentro del sistema de conductos radiculares óptimo para la penetración de agentes antimicrobianos, irrumpiendo el biofilm bacteriano y reduciendo o eliminando toda el microbioma intraconducto.(28) El desbridamiento del espacio del conducto radicular es crucial para el éxito del tratamiento endodóntico. Los microorganismos más frecuentemente asociados con los fracasos en tratamientos endodónticos son *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans.* (1)

E. faecalis ha demostrado una alta resistencia, la capacidad de inactivar agentes antimicrobianos, la habilidad de sobrevivir en entornos hostiles con escaso suministro de nutrientes y un pH extremadamente alcalino, así como la capacidad de formar biopelículas en las paredes del conducto radicular. (29)

Los hongos son frecuentemente detectados en dentro del sistema de conductos radiculares infectados y han sido aislados con una frecuencia de 3-18%.(30) Una revisión sistemática y un metanálisis mostraron que *Candida albicans* es el hongo más comúnmente aislado seguido de *Candida tropicalis* , *Candida kefyr* , *Candida parapsilosis* , *Candida glabrata* , *Candida krusei* , *Candida dubliniensis* , *Candida*

guilliermondii y *Candida etchellsii* .(31) Además, se le ha asociado a infecciones persistentes y/o infecciones refractarias del conducto radicular. *C. albicans* libera enzimas colagenolíticas que permiten utilizar la dentina como fuente de nutrientes.(32)

Es por ello, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar un protocolo de irrigación endodóntico a base de una solución enzimática e hiperosmótica sobre un biofilm mixto compuesto por dos microorganismos: *E. Faecalis y C. Albicans*

Méndez G. y colaboradores en 2022 (25) utilizaron un biofilm mixto de *E. fecalis* y *C albicans* en la evaluación de sistemas de instrumentación endodóntica, en donde para la formación in vitro de la biopelícula mixta se realizó de forma estática con el medio de cultivo de Infusión Cerebro Corazón (BHI) y Dextrosa-Sabouraud (DS) (75% y 25%, respectivamente); además, se añadieron 50 µl de suero humano al comienzo de la formación de biopelícula para el crecimiento de *C. albicans*. Metodología similar utilizada en esta investigación para lograr el crecimiento óptimo de un biofilm mixto de una bacteria facultativa y un hongo. A Diferencia de Méndez G. se pudo observar formación de biofilm mixto maduro a los 28 días. La metodología en este estudio puede ser replicada para la elaboración de biofilm de *E. fecalis* y *C. albicans.*

En 2023 Velázquez M. y colaboradores (4) evaluaron la actividad antibacteriana de una hidrolasa *T. reesei* (CEL) combinada con una mezcla de antibióticos de amoxicilina con ácido clavulánico (AmC) contra *E. faecalis*. Observaron que para el grupo irrigado con el tratamiento CEL-AmC (50 U/mL, 1000 µg/mL y 250 µg/mL, respectivamente), se midió una reducción de UFC > 90 % y hubo una desintegración concomitante de la EPS, así como ausencia de microorganismos. Resultados que contrastan con los obtenidos en esta investigación, ya que, la solución enzimática *en* combinación con una solución hiperosmótica redujo <10% de microorganismos,

además no se observó diferencia significativa en la disgregación del biofilm intraconducto. Esto se puede explicar por la diferencia de soluciones irrigantes utilizadas ya que Velázquez M. utilizó la enzima en combinación con un antibiótico (amoxicilina con ácido clavulánico), así como la diferencia en la maduración del biofilm evaluado y su método de formación (reactor de flujo por goteo), en esta investigación se probaron las soluciones en un biofilm de 28 días, a diferencia del biofilm evaluado por Velázquez M. de 24h.

Por otra parte, Van der Waals y cols. (2011) realizaron un biofilm de 4 semanas en cubreobjetos de vidrio y pusieron a prueba la Solución Salina modificada con sales y en sus resultados sí hubo una diferencia significativa, al sumergir el biofilm en las soluciones con la diferencia del tiempo de exposición de 60-90 min. (33)(34) También se mencionan las complicaciones que tuvieron en la formación de biofilm ya que el 90% de sus bacterias eran no viables o se encontraban en periodo de latencia. Además, refieren que en sus modelos de placa no es posible formar un biofilm sólido por no existir un sustrato. Mientras que, en este estudio, el biofilm fue también de 28 días y el protocolo de irrigación intraconducto fue lo más parecido a la situación clínica en tiempos y volúmenes, con un tiempo máximo de exposición de 2 minutos con aguja y jeringa de 5 mL. El modelo de biofilm intraconducto que se empleó en este estudio fue en molares extraídos, hubo crecimiento con sinergismo de ambos microorganismos lo cual era comprobado mediante tinciones de Gram cada 48 horas, mientras que la formación de biofilm fue comprobado después de los 28 días en el MEB en el cual se observó un biofilm sólido y maduro.

Galdámez F. y colaboradores en 2019 (21) evaluaron el efecto antimicrobiano de una solución hiperosmótica basada en cloruro de sodio y sorbato de potasio contra *E. faecalis* y *C. albicans* en estado planctónico, los resultados arrojaron que la solución hiperosmótica redujo el conteo de microorganismos de forma similar que

el hipoclorito de sodio al 5.25% con una escala de 0,5 McFarland (90 vs 99.9%), en contacto directo por 5, 10 y 15 min. Por el contrario, En esta investigación se observó que el conteo de UFC posterior a la irrigación por 2 min con la solución hiperosmótica comparado con irrigación de NaClO a 2.25% obtuvo una diferencia significativa, en donde el hipoclorito redujo >99% del conteo de microorganismos en comparación con la solución hiperosmótica (99%, <10%, respectivamente). La diferencia observada en los resultados puede deberse a que Galdámez F. evaluó la solución en condiciones diferentes; es decir, fueron evaluadas con microorganismos en estado planctónico. Se ha demostrado que la formación de biofilm puede aumentar la resistencia de *E. fecalis* hasta un 80%.
Las condiciones intraconducto muestran un ambiente en donde los microorganismos presentes tienen las condiciones ideales para la organización y posterior formación de biofilm, por lo que, las investigaciones *in vitro* que evalúen agentes antimicrobianos deben probarse, en medida de lo posible, en condiciones similares.

Rojas B. y colaboradores en 2020 investigaron el efecto antibacteriano de una solución hiperosmótica que contiene sorbato y etanol en *E. faecalis* en estado planctónico y en biopelícula. Observaron que la solución hiperosmótica con 38.4% de etanol y 0.128 M HCl fue efectivo para la eliminación de *E fecalis* en estado planctónico, además obtuvo un 80% de reducción de biofilm monoespecie de *E. fecalis*. Los resultados obtenidos en este estudio no fueron similares, ya que no se observó una reducción significativa del biofilm de *E. fecalis* y *C. albicans* en contacto con la solución hiperosmótica. Las diferencias observadas en cierta parte, pueden deberse a tres factores importantes: 1) la composición del biofilm, con diferencia en los microorganismos contenidos y tiempo de formación, 2) en este estudio se utilizó la solución hiperosmótica como protocolo de irrigación final y Rojas B. fue utilizado como irrigante entre cada instrumento durante el procedimiento de preparación

biomecánica y 3) La solución hiperosmótica evaluada por Rojas B. estuvo en contacto por mayor tiempo, en comparación con este estudio, potencializando su distribución a lo largo de sistema de conductos radiculares.

Con los resultados obtenidos de conteo de UFC y de observación en el MEB después de la irrigación de las muestras, se determinó que la combinación de estas dos soluciones no logró desintegrar completamente el biofilm *in vitro* que se formó probablemente por las EPS. Sin embargo, la celulasa que se encuentra disponible comercialmente y que descompone los enlaces β-1,4, podría usarse para degradar una gran cantidad de exopolisacáridos de biopelículas en azúcares simples. En el área médica, se ha demostrado que inhibe el crecimiento de biopelículas de *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* en diversas superficies abióticas comúnmente empleadas en dispositivos médicos. (35)

La propuesta de este proyecto fue que la celulasa degradara la EPS del biofilm formado y de esta forma los microorganismos se liberaran a una forma plactónica para que la solución hiperosmótica los eliminara una vez expuestos. Sin embargo, los resultados no fueron del todo favorables quizás debido al tiempo de exposición de la enzima sobre el biofilm.

8 CONCLUSIONES

- Se logró formar un biofilm mixto de *E. Faecalis* y *C. Albicans* por flujo laminar.
- Las enzimas tuvieron poco efecto sobre los polímeros de biofilm maduro.
- La solución hiperosmótica logra eliminar microorganismos en estado platónico, sin embargo, al no estar expuestos de la EPS, no pudieron ser eliminados.
- El NaClO al 2.25% tuvo buenos resultados sobre el biofilm formado.

9 PERSPECTIVAS

- Probar la solución enzimática con la hiperosmótica en un biofilm en proceso de maduración.
- Evaluar la solución enzimática con un mayor tiempo de exposición.
- Probar la acción de la solución enzimática como medicación intraconducto en un biofilm, elevando así el tiempo de exposición.

10 REFERENCIAS

1. Prada I, Mico-Munoz P, Giner-Lluesma T, Mico-Martinez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal. 2019;e364-72.

2. Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Davamani F, Pau A. Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticle against Enterococcus faecalis biofilms in the root canal. BMC Oral Health. diciembre de 2020;20(1):339.

3. Matthes R, Jablonowski L, Holtfreter B, Pink C, Kocher T. Enzymatic biofilm destabilisation to support mechanical cleansing of inserted dental implant surfaces: an in-vitro pilot study. Odontology. octubre de 2021;109(4):780-91.

4. Velázquez-Moreno S, González-Amaro AM, Aragón-Piña A, López-López LI, Sánchez-Sánchez R, Pérez-Díaz MA, et al. Use of a Cellulase from Trichoderma reesei as an Adjuvant for Enterococcus faecalis Biofilm Disruption in Combination with Antibiotics as an Alternative Treatment in Secondary Endodontic Infection. Pharmaceutics. 21 de marzo de 2023;15(3):1010.

5. Gonzalez AM, Corpus E, Pozos-Guillen A, Silva-Herzog D, Aragon-Piña A, Cohenca N. Continuous Drip Flow System to Develop Biofilm of E. faecalis under Anaerobic Conditions. Lin LM, editor. Sci World J. 13 de octubre de 2014;2014:706189.

6. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology: Calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endod J. agosto de 2011;44(8):697-730.

7. Guerrero F, Mendoza A, Ribas D, Aspiazu K. Apexification: A systematic review. J Conserv Dent. 2018;21(5):462.

8. Siqueira JF, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. Int Endod J. mayo de 2022;55(S3):512-30.

9. Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, et al. *In vitro* biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA ®. Int Endod J. diciembre de 2014;47(12):1133-41.

10. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. Endod Top. septiembre de 2012;27(1):74-102.

11. Cai C, Chen X, Li Y, Jiang Q. Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment. Guven Y, editor. BioMed Res Int. 13 de enero de 2023;2023:1-17.

12. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm Formation Capability of Enterococcus faecalis Cells in Starvation Phase and Its Susceptibility to Sodium Hypochlorite. J Endod. abril de 2010;36(4):630-5.

13. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. Br Dent J. marzo de 2014;216(6):299-303.

14. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. 2 de agosto de 2010;

15. Allen P, Whelan W. The mechanism of carbohydrase action. 9. Hydrolysis of salep mannan by preparations of α-amylase. Biochem J. 1 de julio de 1963;88(1):69-70.

16. Wong-Madden ST, Landry D. Purification and characterization of novel glycosidases from the bacterial genus *Xanthomonas*. Glycobiology. 1995;5(1):19-28.

17. Karatan E, Watnick P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. Microbiol Mol Biol Rev. junio de 2009;73(2):310-47.

18. Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. Ghannoum M, Parsek M, Whiteley M, Mukherjee P, editores. Microbiol Spectr. 18 de junio de 2015;3(3):3.3.29.

19. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic Basis of *Candida* Biofilm Resistance Due to Drug-Sequestering Matrix Glucan. J Infect Dis. julio de 2010;202(1):171-5.

20. Xie Z, Thompson A, Sobue T, Kashleva H, Xu H, Vasilakos J, et al. Candida albicans Biofilms Do Not Trigger Reactive Oxygen Species and Evade Neutrophil Killing. J Infect Dis. 15 de diciembre de 2012;206(12):1936-45.

21. Galdámez Falla VM, González Amaro AM, González Ortega O, Cárdenas JM, Gutiérrez Cantú FJ, Vitales Noyola M, et al. Antimicrobial effect of a hyperosmotic solution on endodontic microorganisms in planktonic state. Investig Clínica. 1 de junio de 2019;60(1):38-46.

22. Hegde R, Bapna K. Comparison of removal of endodontic smear layer using ethylene glycol bis (beta-amino ethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid and citric acid in primary teeth: A scanning electron microscopic study. Contemp Clin Dent. 2016;7(2):216.

23. Fernandez CL. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. 2003;(17).

24. Mourey Valdés L. NORMA Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. 1994; Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4869946&fecha=27/02/1995#gsc.tab=0

25. Méndez-González V, Casillas-Contreras C, Vitales-Noyola M, Alvarado-Hernández DL, González-Amaro AM, Aragón-Piña A, et al. Elimination of E. faecalis and C. albicans Biofilm: A Comparison Between Single and Multiple File Systems in an Ex Vivo Study. Odovtos - Int J Dent Sci. 15 de noviembre de 2022;311-22.

26. Rojas Briones ME, Oliva Rodríguez R, González Ortega O, González Amaro AM, Mariel Cárdenas J, Avelar González FJ, et al. Antibacterial effect of a hyperosmotic solution containing sorbate and ethanol on Enterococcus faecalis in planktonic form and as biofilm: an in vitro study. Investig Clínica. junio de 2020;61(2):105-16.

27. Fanta Dental ENDODONTIC PRODUCTS CATALOGUE [Internet]. Disponible en: https://www.fanta-dental.com/static/upload/file/20220606/1654507479999515.pdf

28. Gomes BPFA, Aveiro E, Kishen A. Irrigants and irrigation activation systems in Endodontics. Braz Dent J. agosto de 2023;34(4):1-33.

29. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of Enterococcus faecalis as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. Cureus [Internet]. 13 de marzo de 2020 [citado 12 de julio de 2024]; Disponible en: https://www.cureus.com/articles/28829-the-influence-of-enterococcus-faecalis-as-a-dental-root-canal-pathogen-on-endodontic-treatment-a-systematic-review

30. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. mayo de 2004;97(5):632-41.

31. Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of Candida Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. J Endod. noviembre de 2018;44(11):1616-1625.e9.

32. Yoo YJ, Kim AR, Perinpanayagam H, Han SH, Kum KY. Candida albicans Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. Microorganisms. 26 de agosto de 2020;8(9):1300.

33. Van Der Waal SV, Jiang L, De Soet JJ, Van Der Sluis LWM, Wesselink PR, Crielaard W. Sodium chloride and potassium sorbate: a synergistic combination against *E nterococcus faecalis* biofilms: an *in vitro* study. Eur J Oral Sci. octubre de 2012;120(5):452-7.

34. Van Der Waal SV, Van Der Sluis LWM, Özok AR, Exterkate RAM, Van Marle J, Wesselink PR, et al. The effects of hyperosmosis or high pH on a dual-species biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* : an *in vitro* study. Int Endod J. diciembre de 2011;44(12):1110-7.

35. Rajasekharan SK, Ramesh S. Cellulase Inhibits Burkholderia cepacia Biofilms on Diverse Prosthetic Materials. Pol J Microbiol. 2013;62(3):327-30.

11 ANEXOS

INSTRUCCIONES PARA ELABORAR LA SOLUCIÓN HIPEROSMÓTICA

1. Se pesa en la balanza analítica automática (Denver Instrument) 15.02 g del sorbato de potasio, así como 8.77 de cloruro de sodio.
2. En un agitador de placa calefactora (LabTech) se coloca un vaso de precipitado con agua destilada con agitación magnética. Poco a poco se agrega el sorbato de potasio hasta que este se disuelva, y posteriormente se agrega el cloruro de sodio.
3. Una vez disueltos los solutos, se agrega al vaso de precipitado el ácido clorhídrico y el alcohol.
4. Cuando se obtiene una solución homogénea, se verifican los 100 mL deseados.
5. La solución se conserva en un envase color ámbar y se almacena a temperatura ambiente hasta su uso.

Las soluciones base para elaborar la solución fueron:

- Cloruro de Sodio PM=58,44 g/mol (Sigma-Aldrich)
- Sorbato de potasio PM=150.22 g/mol (Jalmek)
- Agua desionizada RA PM=18.00 g/mol (Fermont)
- Alcohol etílico 96º PM 46.07 g/mol (CTR)
- Ácido clorhídrico PM= 36.46 g/mol (Fermont)

La solución se realizó basándonse en la siguiente fórmula para la preparación de 100 mL

- 1M de KS
- 1.5 M de NaCl
- 0.051 M de HCl
- Alcohol al 38.4%

$$M = \frac{moles}{L}$$

Para 100 mL

- Sorbato de Potasio:
  (0.1L) (150.22 g)/ 1L= 15.02 g

- Cloruro de Sodio:
  (0.1L) (87.66 g)/ 1 L= 8.77 g

- Ácido clorhídrico:
  (0.051 M)(100mL)/10.26 M= 0.5 mL

- Alcohol etílico
  (38.4%) (100 mL)/ 99.5% = 38.59 mL

- Agua desionizada
  100 mL – (0.5 mL + 38.59 mL)= 60.91 mL