



31441

2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES.
I Z T A C A L A

Migración de *Streptococcus Mutans in vitro* en
conducto radicular y túbulos dentinarios

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALIDAD EN ENDOPERIODONTOLOGÍA

PRESENTA:

C.D. OSCAR FRANCISCO L GÁMIZ HERNÁNDEZ

ASESORES:

DR. EDUARDO LLAMOSAS HERNÁNDEZ
DR. ALBERTO FURUYA MEGURO

2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Migración de *Streptococcus mutans in vitro* en conducto radicular y túbulos dentinarios.

Después de un raspado y alisado radicular en la terapia periodontal convencional puede haber penetración bacteriana dentro del conducto radicular y los túbulos dentinarios en un diente tratado endodónticamente.

INTRODUCCIÓN

La microfiltración ha sido considerada como la principal causa de los fracasos endodónticos por más de 40 años (1). Así también se ha determinado que aproximadamente 60% de los fracasos endodónticos son debidos a la inadecuada obturación del sistema de conductos radiculares (2). En 1955 los doctores Dow & Ingle (3) realizaron el primer estudio *in vitro* de microfiltración endodóntica donde demostraron que efectivamente existe filtración hacia el interior de los conductos radiculares defectuosamente obturados.

Sin embargo, otros autores han puesto en duda estas teorías de microfiltración, ya que en la actualidad se considera que exclusivamente la filtración bacteriana es causante del fracaso endodóntico (4-6).

Debido a estos dos descubrimientos se plantearon diversas teorías acerca del fracaso de los tratamientos endodónticos cuando existe filtración hacia el interior de los conductos radiculares, estas teorías están basadas en que en el tejido periapical existe una constante circulación de líquidos tisulares que pueden entrar a los espacios vacíos de las obturaciones, en donde quedan atrapados y sufren un proceso degenerativo. Posteriormente estos productos salen lentamente del conducto radicular y crean constantemente un foco de irritación en el tejido periapical, esta constante irritación al cabo del tiempo se transforma en un

proceso patológico de los tejidos periapicales, lo cual indica clínicamente que ha ocurrido un fracaso en la terapia endodóntica.

A pesar que estas teorías han sido ampliamente discutidas los resultados obtenidos por diferentes grupos resultan ser contradictorios. Kakehashi y cols. en 1965 (7) demostraron que no es posible que existan reacciones periapicales aún cuando la pulpa dental se encuentra necrótica, a menos que esto suceda en presencia de bacterias.

Una posible razón de la persistencia de la infección puede ser la invasión de microorganismos en los tejidos de las paredes del conducto radicular y de los túbulos dentinarios (8-11).

Sin embargo, debemos tener en cuenta que en dientes vitales, los túbulos dentinarios están llenos de las prolongaciones citoplasmáticas del proceso odontoblástico, fibras de colágena y fluidos dentinales, y su principal función es comunicar el trayecto entre la dentina y la pulpa dental. Por consiguiente, el avance de las bacterias tiene que ser directamente a través de los túbulos dentinarios en desarrollo. Lo anterior parece no ser igual en el caso de los dientes vitales con funciones normales de la pulpa y en dientes que tienen la pulpa removida en los que el contenido de los túbulos ha cambiado (7).

Debemos considerar que el proceso odontoblástico ocupa considerable espacio en los túbulos dentinarios, esto es un proceso natural que sirve como una barrera física efectiva ante en la invasión bacteriana en dientes vitales (8-11).

Comúnmente algunos de los microorganismos que se encuentran dentro del conducto radicular son rápidamente eliminados cuando entran en contacto con las soluciones antisépticas *in vitro* (12). Sin embargo, no se conoce la viabilidad de los microorganismos que se encuentran en el interior del conducto radicular así como los que se encuentran en los túbulos dentinarios después de estar expuestos a las soluciones antisépticas *in vivo*.

Por otra parte, debemos considerar que el destino de las bacterias después del procedimiento de desinfección y el de obturación es variable. De acuerdo a Morse, existen tres posibilidades para los microorganismos dentro de los túbulos dentinarios después del tratamiento endodóntico: pueden permanecer inactivas, morir o multiplicarse usando el remanente orgánico de los canales accesorios.

La colonización de microorganismos en un conducto radicular infectado se puede reducir significativamente por la instrumentación, la irrigación y el sellado. Sin embargo, algunos microorganismos que se alojan en la pulpa dental y paredes del conducto radicular no pueden ser removidos por la instrumentación, y se sabe poco acerca de la viabilidad y resistencia en medicación intra-conducto *in situ* (10).

La presencia de bacterias en el interior del conducto radicular después de haber recibido una terapia endodóntica puede llevar al fracaso de la misma, debido a lo anterior es de vital importancia tenerlo en cuenta cuando se realiza una terapia periodontal.

Las bacterias pueden llegar al conducto de diferentes formas, una de ellas es por medio de la invasión cariosa principalmente, la cual puede llevar a la muerte parcial o total de la pulpa dental y en una de sus consecuencias puede llevar a la presencia de reacciones periapicales en conjunto con la presencia de bacterias en el conducto radicular y en los túbulos dentinarios, sin embargo debemos tener en cuenta que si las bacterias pueden migrar a través del conducto radicular a los túbulos dentinarios, debemos suponer que las bacterias también pueden migrar a través de los conductos laterales, accesorios y los túbulos dentinarios desde la dentina expuesta en una terapia periodontal, o sin terapia periodontal por vecindad.

Por otra parte debemos tomar en cuenta la clasificación de las enfermedades Endoperiodontales que hacen los doctores Simon, Glick & Frank en 1972. Cuadro 1. (13).

Donde podríamos mencionar la lesión Endoperio tipo III IV y V; que son representativas de cómo posiblemente las bacterias invaden el conducto radicular a través de los túbulos dentinarios y conductos accesorios.

LESIONES ENDOPERIODONTALES

Lesión Tipo I	Lesión Endodóntica primaria.
Lesión Tipo II	Lesión Endodóntica primaria con afectación Periodontal secundaria.
Lesión Tipo III	Lesión Periodontal primaria.
Lesión Tipo IV	Lesión Periodontal primaria con afectación Endodóntica secundaria.
Lesión Tipo V	Lesiones Combinadas.

Cuadro I

JUSTIFICACION

Cuando se realiza un raspado y alizado radicular de manera inapropiada raspando el cemento excesivamente, y así exponiendo la dentina durante la terapia periodontal, exponiendo los túbulos dentinarios, puede ocasionar al inicio una necrosis pulpar en el caso de un diente vital, conduciendo posteriormente a un proceso infeccioso. Debido ha esto es importante conocer la capacidad de migración de las bacterias a través de los túbulos dentinarios hacia el conducto radicular.

PROPOSITO

El propósito de este estudio es evidenciar la migración *in vitro* de *Streptococcus mutans* desde la superficie radicular hacia los túbulos dentinarios y el conducto radicular después de simular una terapia periodontal convencional, tomando en cuenta que el conducto radicular se encuentra tratado endodónticamente.

HIPOTESIS

Ho¹ Si el raspado y alizado radicular provocan mayor permeabilidad de los túbulos dentinarios, entonces las bacterias penetran con mayor facilidad hacia el interior del conducto una vez que el diente ha sido sometido a esta terapia periodontal.

Ho² El raspado y alizado radicular no provoca una mayor permeabilidad de los tubulos dentinarios, por lo cual las bacterias tienen la misma capacidad de penetración a través de los tubulos dentinarios.

Ho³ Cuando el conducto radicular se encuentra onturado de manera correcta tridimensionalmente las bacterias no tienen ninguna oportunidad de invadir el conducto de tal manera que mueren o permanecen inactivas.

JUSTIFICACION

Cuando se realiza un raspado y alizado radicular de manera inapropiada raspando el cemento excesivamente, y así exponiendo la dentina durante la terapia periodontal, exponiendo los túbulos dentinarios, puede ocasionar al inicio una necrosis pulpar en el caso de un diente vital, conduciendo posteriormente a un proceso infeccioso. Debido ha esto es importante conocer la capacidad de migración de las bacterias a través de los túbulos dentinarios hacia el conducto radicular.

PROPOSITO

El propósito de este estudio es evidenciar la migración *in vitro* de *Streptococcus mutans* desde la superficie radicular hacia los túbulos dentinarios y el conducto radicular después de simular una terapia periodontal convencional, tomando en cuenta que el conducto radicular se encuentra tratado endodónticamente.

HIPOTESIS

Ho¹ Si el raspado y alizado radicular provocan mayor permeabilidad de los túbulos dentinarios, entonces las bacterias penetran con mayor facilidad hacia el interior del conducto una vez que el diente ha sido sometido a esta terapia periodontal.

Ho² El raspado y alizado radicular no provoca una mayor permeabilidad de los tubulos dentinarios, por lo cual las bacterias tienen la misma capacidad de penetración a través de los tubulos dentinarios.

Ho³ Cuando el conducto radicular se encuentra onturado de manera correcta tridimensionalmente las bacterias no tienen ninguna oportunidad de invadir el conducto de tal manera que mueren o permanecen inactivas.

JUSTIFICACION

Cuando se realiza un raspado y alizado radicular de manera inapropiada raspando el cemento excesivamente, y así exponiendo la dentina durante la terapia periodontal, exponiendo los túbulos dentinarios, puede ocasionar al inicio una necrosis pulpar en el caso de un diente vital, conduciendo posteriormente a un proceso infeccioso. Debido ha esto es importante conocer la capacidad de migración de las bacterias a través de los túbulos dentinarios hacia el conducto radicular.

PROPOSITO

El propósito de este estudio es evidenciar la migración *in vitro* de *Streptococcus mutans* desde la superficie radicular hacia los túbulos dentinarios y el conducto radicular después de simular una terapia periodontal convencional, tomando en cuenta que el conducto radicular se encuentra tratado endodónticamente.

HIPOTESIS

Ho¹ Si el raspado y alizado radicular provocan mayor permeabilidad de los túbulos dentinarios, entonces las bacterias penetran con mayor facilidad hacia el interior del conducto una vez que el diente ha sido sometido a esta terapia periodontal.

Ho² El raspado y alizado radicular no provoca una mayor permeabilidad de los tubulos dentinarios, por lo cual las bacterias tienen la misma capacidad de penetración a través de los tubulos dentinarios.

Ho³ Cuando el conducto radicular se encuentra onturado de manera correcta tridimensionalmente las bacterias no tienen ninguna oportunidad de invadir el conducto de tal manera que mueren o permanecen inactivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Distribución de Especímenes

La población en estudio será seleccionada mediante un muestreo de tipo no probabilístico. Se utilizarán 72 raíces de dientes humanos recientemente extraídos los cuales serán divididos aleatoriamente en 3 grupos experimentales y 2 categorías (A y B).

La categoría A será de especímenes a los cuales no será raspada la superficie radicular.

En la categoría B será tratada de acuerdo a su grupo experimental donde será raspada y alisada la superficie radicular con curetas de tipo Gracey y Mc Call.

Los especímenes del grupo I servirán como grupo control (no obturados). El grupo II será obturado utilizando la técnica de condensación lateral exclusivamente con gutapercha (Hygenic Corp., Akron, OH) simulando una defectuosa obturación. Grupo III será obturado con gutapercha en combinación con un sellador endodóntico (Tubli-Seal, Kerr Mfg. Co, Romulos, MI).

Selección de Especímenes

Inmediatamente después de la extracción, los dientes se colocaran en suero fisiológico y se mantendrán en refrigeración. Las coronas se seccionaran en la unión cemento-esmalte con discos finos de diamante (Komet™, Lemgo Germany), a baja velocidad enfriandose con agua. Los cortes se realizarán perpendicularmente al eje longitudinal de las raíces.

Se limpiarán las superficies radiculares de todos los especímenes con curetas de tipo Gracey y de tipo Mc Call con el fin de eliminar cálculos dentarios y restos de tejido blando. Posteriormente, los especímenes se enjuagaran varias veces con agua corriente y cada uno se colocara dentro de uno de los 48 pozos

de las placas para microtitulación (Costar™). Los pozos de las placas para microtitulación se llenaran con suero fisiológico hasta que todos los especímenes queden cubiertos y se mantendrán en incubación a 37°C hasta antes de iniciar la preparación de los conductos. Se examinarán todos los especímenes utilizando un estereomicroscopio (Nikon SMZ-2T), para verificar que ninguno presente defectos en el cemento radicular, microfracturas o ápices inmaduros y mal formados.

Para comprobar que ningún espécimen presente calcificaciones apicales, se introducirá una lima tipo Flex-R No. 10 (Union Broach, Emigsville, PA) dentro del conducto radicular la cual será pasada a través del forámen hasta que la punta se encuentre a 1 mm de la superficie externa del forámen apical.

Los conductos que presenten calcificaciones serán descartados como especímenes de estudio. Durante este procedimiento se registrará la longitud total de cada uno de los especímenes la cual será considerada como la distancia real entre el forámen apical y la superficie cervical. Se descartarán del estudio los especímenes que midan menos de 12 mm.

Se tomarán radiografías de todos los especímenes en dos vistas: mesio-distal y vestibulo-lingual. Dichas radiografías se tomarán con una lima No. 10 dentro del conducto radicular colocada a través de la longitud total del espécimen correspondiente.

Mediante la inspección radiográfica se corroborará que los especímenes tengan un solo conducto radicular, que no presenten reabsorciones internas, que no exista tratamiento endodóntico previo y se determinará la medida en grados de la curvatura de cada conducto, curvaturas < 25 grados de acuerdo al método descrito por Schneider (14), de tal manera que se consideraran las curvaturas de los conductos y no de las raíces en relación al eje longitudinal del conducto en cualquiera de las dos vistas.

Todos los especímenes que se utilizaran en el presente estudio, serán seleccionados en base a los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- a) Cualquier diente natural anterior o posterior.
- b) Raíces con un conducto principal.
- c) Dientes con ápices maduros y bien formados.
- d) Raíces con curvaturas radiculares menores de 25 grados.
- e) Raíces con una longitud mayor a 12 mm.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- a) Dientes con características contrarias a los puntos anteriores.
- b) Raíces con caries o algún otro tipo de destrucción.
- c) Dientes con fracturas radiculares.
- d) Dientes con reabsorción interna o externa.
- e) Conductos con tratamiento endodóntico previo.
- f) Dientes con calcificación que no permita el paso de una lima No. 10 a través del foramen apical.
- g) Raíces con pérdida del cemento radicular.

Una vez realizada la selección final de los especímenes, aquellos que se consideren adecuados serán transferidos a placas para microtitulación nuevas en las cuales se distribuirán aleatoriamente tomando en consideración únicamente su longitud. De esta manera, el conjunto de todas las muestras en cada grupo presentara una longitud promedio de 13.92 mm.

Todos los especímenes que se utilizaran en el presente estudio, serán seleccionados en base a los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- a) Cualquier diente natural anterior o posterior.
- b) Raíces con un conducto principal.
- c) Dientes con ápices maduros y bien formados.
- d) Raíces con curvaturas radiculares menores de 25 grados.
- e) Raíces con una longitud mayor a 12 mm.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- a) Dientes con características contrarias a los puntos anteriores.
- b) Raíces con caries o algún otro tipo de destrucción.
- c) Dientes con fracturas radiculares.
- d) Dientes con reabsorción interna o externa.
- e) Conductos con tratamiento endodóntico previo.
- f) Dientes con calcificación que no permita el paso de una lima No. 10 a través del foramen apical.
- g) Raíces con pérdida del cemento radicular.

Una vez realizada la selección final de los especímenes, aquellos que se consideren adecuados serán transferidos a placas para microtitulación nuevas en las cuales se distribuirán aleatoriamente tomando en consideración únicamente su longitud. De esta manera, el conjunto de todas las muestras en cada grupo presentara una longitud promedio de 13.92 mm.

Preparación de Conductos

Todos los conductos serán preparados a 1 mm de la longitud real del conducto. Esta medida se obtendrá restándole un milímetro a la longitud total anteriormente registrada. Los conductos se prepararan con limas tipo Flex-R (Union Broach) de acuerdo con los lineamientos de la técnica de 'fuerzas balanceadas'. Siguiendo dicha técnica, la porción apical de los conductos se ensanchara hasta un diámetro equivalente al de una lima No. 45. Posteriormente, la porción intermedia será ensanchada restándole a cada instrumento 1 mm de longitud hasta la lima No. 70. Por último, se instrumentara la porción cervical de los conductos con fresas Gates-Glidden (Caulk/Dentsply, Milford, DE) números 2, 3 y 4.

Una vez terminada la preparación de los conductos, estos serán irrigados con 10 cm³ de ácido etilendiaminotetraacético-Cetavión (EDTAC) en solución al 17%, de acuerdo a la fórmula descrita por Grossman y cols.(15).

Posteriormente, se efectuará una irrigación final con 10 cm³ de hipoclorito de sodio al 5.25%, con el objeto de eliminar la capa superficial o lodo dentinario.

Esterilización de los Especímenes

Una vez terminada la preparación de los conductos radiculares, los especímenes serán esterilizados en autoclave a 121°C por 30 min. con el objeto de eliminar las bacterias que pudiesen haber quedado dentro del conducto radicular así como las que se encontraban en los túbulos dentinarios. La esterilización será verificada colocando uno de los especímenes al azar en caldo de soya tripticaseina por 7 días a 37°C en condiciones aeróbicas.

Obturación de los conductos

Bajo estrictas condiciones asépticas, los conductos serán secados con puntas de papel estériles (Caulk/Densply) y serán obturados de acuerdo a su grupo

ESTA TESIS NO DEBE
SER PRESTADA
SIN LA APROBACIÓN DE LA BIBLIOTECA

experimental, como ya se menciona anteriormente. La condensación lateral se llevara a cabo utilizando finger spreaders (Kerr) introduciéndolos a 1 milímetro de la longitud de trabajo como lo marca la técnica, todos estos procedimientos serán realizados bajo una campana de flujo laminar tipo II (NUARIE Biological safety Cavinets-Class II Type II A/B3), por un solo operador especializado.

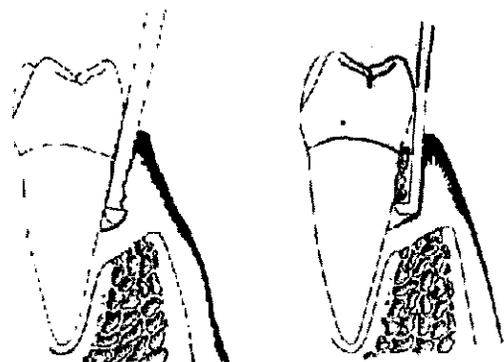
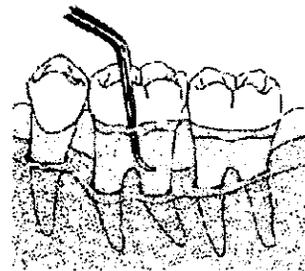
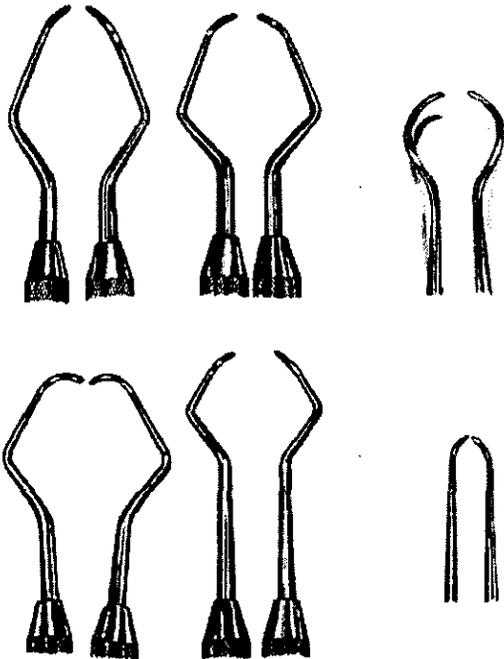
	Grupo I Grupo control	Grupo II Obturados con gutapercha	Grupo III Obturados con gutapercha y un sellador Endodóntico	Total
Categoría A	12	12	12	36
Categoría B	12	12	12	36
Número de Especímenes				72

Una vez terminada la obturación de los conductos, la entrada de los mismos será sellada con un tapón de Cavit™ (ESPE) sobre el cual se colocaran dos capas de barniz para uñas. Esto se realizará con el fin de sellar y evitar la filtración a través de los túbulos dentinarios que se encontraban expuestos en esta zona por el corte de las coronas.

Raspado y Alisado de la superficie radicular

Una vez terminado el procedimiento de obturación de los conductos se procederá a raspar y alisar la superficie radicular de los especímenes simulando un tratamiento periodontal de acuerdo a su categoría, este procedimiento se llevara a cabo con curetas Gracey y Mc Call, durante el raspado y alisado se tomaran 3 zonas del diente a tratar dividiendo estas zonas en tercios de tal manera que se raspara el tercio cervical, el tercio medio y el tercio apical, cada uno de estos tercios será raspado y alisado de 20 a 25 veces, tratando así de que siempre la cureta pase por el mismo tercio, exponiendo así los tubulos dentinarios.

Todos estos procedimientos serán realizados por un especialista en materia para así estandarizar la fuerza con que se raspa y alisa la superficie dentaria, así como la habilidad de manejar los instrumentos.



Cultivos Bacterianos

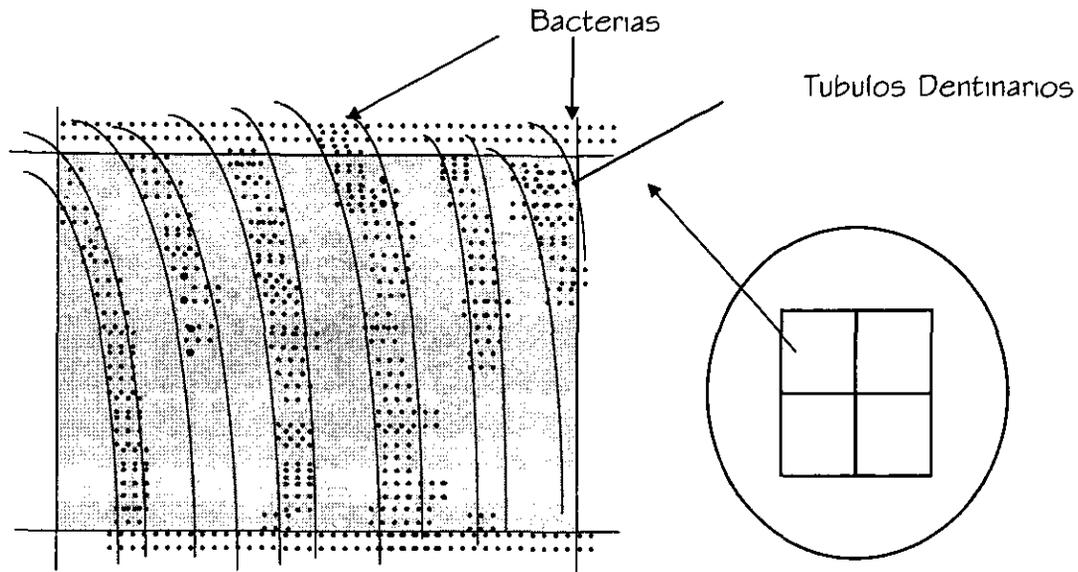
Se cultivarán *Streptococcus mutans* (ATCC 12600) a 37°C en caldo de soya tripticaseína, y se determinará su curva de crecimiento, con el objeto de determinar cuando es necesario recambiar el medio de cultivo bacteriano para que las bacterias siempre se encuentren viables.

Período de Inmersión

Una vez determinada la fase exponencial del *Streptococcus mutans* los especímenes se colocarán en posición vertical dentro de una placa para microtitulación que contenga un mililitro de la suspensión bacteriana, el medio de cultivo se tendrá que cambiar de acuerdo a los resultados que se obtengan en la curva de crecimiento ya que deberá de mantener a la bacteria viable durante 14 días en condiciones aeróbicas a 37°C, siempre en condiciones estériles para que exista contaminación en el medio de cultivo.

Cálculo de la Invasión Bacteriana

El porcentaje de la filtración bacteriana se obtendrá examinando cada una de las laminillas utilizando la magnificación (100x), con un microscopio de campo de luz claro, con un ocular cuadrulado, el conteo se realizará dos milímetros por arriba del ápice en cada uno de los especímenes midiendo hasta la totalidad de la migración.



Micrometro X100

Ilustración esquemática del método propuesto para medir el grado de invasión bacteriana.

Análisis Estadístico

Los resultados serán analizados con la media y la desviación estándar calculados para cada grupo estadísticamente a través de la prueba múltiple de rangos, Student-Newman-Keuls con un nivel de significancia de 0.05

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Ingle JI, Taintor JF. Endodontics 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985:36.
- 2.-Ingle JI & Taintor JF. Endodoncia. Trad. José Luis García Martínez, 3ª edición, nueva editorial interamericana, México, 1988, 913pp, pág. 30.
- 3.-Dow PR & Ingle JI. Isotope determination of root canal failure. *Oral Surg* 1955;8:1100-4.
- 4.-Perez F, Calas P, Falguerolles A & Maurette A. Migration of a *Streptococcus sanguis* Strain through the root Dentinal Tubules. *J Endodon* 1993;19:297-301.
- 5.-Safavi K.E, Spangberg L.S.W. & Langeland K. Root Canal Dentinal Tubule Desinfection. *J Endodon* 1990;16:207-10.
- 6.-Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu H, Iwamoto Y, Kitano M & Kawagoe M. Bacterial Invasion into Dentinal Tubules of Human Vital and Nonvital Teeth. *J Endodon* 1995;21:70-3
- 7.-Kakehashi S, Stanley H.R. & Fitzgerald R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.* 1965;20:340-49
- 8.-Chirnside IM. The bacteriological status of dentine around infected pulp canals. *New Zealand Dent J* 1995;54:173-83.

- 9-.Shovelton DS. The presence and distribution of micro-organisms within non-vital teeth. *Br Dent J* 1964;117:101-7.
- 10-.Akpatan ES & Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. *J Dent Res* 1982;61:435-8.
- 11-.Haapasalo M & Qrstavik D: *In vitro* infection and desinfection of detinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.
- 12-.Spanberg L Endodontics Medicaments. In: Smith DC, Williams DF, eds. *Biocompatibility of dental materials*. Boca Raton, CRC Press, 1982;223-57.
- 13-.Simon J.H.S., Glick.D.H. and Frank A.L. The relationship of endodontic/periodontic lesions. *J Periodontol* 1972; 43:202.
- 14-.Schneider SW. A comparison of canal preparations in straight and curved root canals. *Oral Surg* 1971;32:271-5.
- 15-.Grossman LI, Oliet S & Del Rio CE. Endodontic practice. 11a edición, editorial Lea & Febiger, U.S.A., 1988, 371pp, págs 222-5.
- 16-.Foster KH, Kulild JC & Weller RN. Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. *J Endodon* 1993;19:136-40.

- 17-.Michelich VJ, Schuster GS & Pashley DH. Bacterial penetration of human dentin *in vitro*. *J Dent Res* 1980;59:1395-1403.
- 18-.Vojinovic O, Nyborg H & Brännström M. Acid treatment of cavities under resin fillings: Bacterial growth in dentinal tubules and pulpal reactions. *J Dent Res* 1973;52:1189-93.
- 19-.Brännström M & Nordenvall KJ. Bacterial penetration, pulpal reaction and the inner surface of concise enamel bond. Composite fillings in the etched and uneched cavities. *J Dent Res* 1978;57:3-10.
- 20-.Brännström M & Johnson G. Effects of various conditioners and cleaning agents on prepared dentin surfaces: A scanning electron microscopic investigation. *J Prosth Dent* 1974;31:422-30.
- 21-.Chirnside IM. Bacterial invasion of non-vital dentin. *J Dent Res* 1961;40:134-40.
- 22-.Morse RD. The endodontic culture technique: an impractical and unnecessary procedure. *Dent Clin North Am* 1971;15:793-806.
- 23-.Grossman LI. Endodontic practice. 10th de. Philadelphia: Lea & Febiger, U.S.A., 1981:277.
- 24-.Foley DB, Weide FS, Hagen JC, & deObarrio JJ. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacteroides melaninogenicus* from de root canal system: an *in vitro* study. *J Endodon* 1983; 9:236-41.