



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

TEMA:

Evaluación antimicrobiana del hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio ante biopelículas de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* en un estudio IN-VITRO

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN ODONTOLOGIA

P R E S E N T A:

EVELINE VANESSA GUERRERO SOTO

TUTORA:

PALOMA NETZAYELI SERRANO DIAZ

ASESORES

DENISSE KARINA ORIHUELA GUDIÑO

RAVICHANDRAN MANISEKARAN



Unidad León
Escuela
Nacional de
Estudios
Superiores



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.

Dedicatoria

A Dios por darme las oportunidades que he tenido en esta vida, salud y a mi familia.

A mis padres, la vida no me alcanzará para agradecer a mis padres todo lo que han hecho por mí, Tomasa y Francisco mi principal inspiración, gracias por su apoyo, por su trabajo arduo de cada día para darme educación y apoyar mis sueños, y sobre todo por el amor que me dan en cada acción y cada palabra de aliento. El concluir esta carrera no hubiera sido posible sin ustedes.

Los amo con el alma.

A mi hermana que fue mi conejillo de indias en algunas prácticas durante pandemia, por su apoyo durante la universidad.

A grandes amistades con las que coincidí en el campus, mi grupito durante años de la carrera y a las niñas de endoperio que se han convertido en grandes amigas, permanecerá siempre en mi memoria tantos buenos momentos en clínica.

Y sobre todo a Val que siempre estuvo y esta.

A mis amistades fuera de la universidad Estela, César y Juli, que se han convertido en más que amigos todos estos años, gracias por tanto.

A cada uno de los docentes que han sido parte de mi formación, sin duda cada uno de sus consejos y sus enseñanzas me han formado como odontóloga, gracias por ese amor a la docencia.

Agradecimientos

Agradezco a la ENES UNAM León porque tuve el privilegio de tener esta formación profesional en sus aulas, sus clínicas y con sus docentes.

A la Dra. Paloma Netzayeli Serrano Díaz, mi admiración para usted y agradecimiento enorme por ser mi tutora, por enseñarme el mundo de la investigación con tanta pasión, apoyarme y darme ánimos a cada paso de este proyecto cuando en ocasiones las cosas no salían como planeábamos.

A la Dra. Denisse Karina Orihuela Gudiño, su amor a la endodoncia me generó que yo también me apasionará por esta área. Gracias por su apoyo, sus consejos, enseñanzas desde las clases, clínica y en el ámbito laboral.

Al Dr. Ravichandran por su acompañamiento en mi investigación en el laboratorio en un mundo que era nuevo para mi.

Agradecimiento a la Dra. Elsa Nydia Hernández Ríos por su apoyo y acompañamiento con los resultados con una toma en técnica con microscopio óptico confocal en la ENES Juriquilla UNAM.

Al Dr. Manuel Aguilar Franco del Laboratorio de Microscopía del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) por su apoyo en la obtención de las microfotografías de microscopio electrónico de barrido.

A cada uno de los doctores que se encuentran en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES León UNAM porque siempre mostraron su disposición y apoyo y siempre recibí un trato amable cada día en laboratorio.

Abreviaturas

mm	Milímetros
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
XTT	2, 3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil) -(2H)-tetrazolio-5-carboxanilida
SEM	Microscopia electrónica de barrido
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
BHI	Infusión cerebro-corazón
PBS	Disolución salina tamponada con fosfato
MTP	Placas de microtitulación
CFU	Conteo de unidades formadoras de colonias
NaClO	Hipoclorito de sodio
CHX	Clorhexidina
Ca(ClO) ₂	Hipoclorito de calcio

Índice

Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	8
2. Marco teórico	10
2.1 Biopelículas	10
.....	11
2.1.1 Modelos <i>IN- VITRO</i> de biopelículas	11
2.2 Caracterización microbiológica	12
2.2.1 XTT	13
2.2.2 Cristal violeta	13
2.3 Microscopía: principio y funcionamiento	14
2.3.1 Microscopio de barrio láser confocal (CSLM)	14
.....	15
2.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	15
.....	16
2.4 Infecciones endodónticas	16
2.5 Fracaso del tratamiento de conductos	18
2.6 <i>Enterococcus faecalis</i>	18
2.7 <i>Candida albicans</i>	19
2.8 Biopelícula du-especie inter-reino	19
2.9 Limpieza y desinfección del sistema de conductos radiculares	20
2.10 Irrigantes	21
2.10.1 Hipoclorito de sodio	22
2.10.2 Hipoclorito de calcio	23
3. Antecedentes	25
4. Planteamiento del problema	26
5. Pregunta de investigación	28
6. Justificación	29
7. Objetivos	30
7.1 Objetivo general	30
7.2 Objetivos específicos	30
8. Hipótesis	31
9. Diseño metodológico	32
10. Variables	33

11. Criterios de selección	37
11.1 Criterios de inclusión.....	37
11.2 Criterios de exclusión	37
11.3 Criterios de eliminación	37
12. Material y equipo.....	38
13. Metodología	39
13.1 Preparación de la muestra	39
13.2 Fase 1: Desarrollo de biopelículas.....	42
13.2.1 Cepas clínicas	42
13.2.2 Inoculación de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i> de manera planctónica y biopelículas independientes.....	43
13.3 Ensayo XTT.....	44
13.4 Ensayo Cristal Violeta.....	45
13.5 Microscopía láser de barrido confocal (CLSM).....	47
13.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	48
13.7 Fase 2: Protocolo de irrigación.....	49
.....	49
13.7.1 Cepas clínicas	50
13.7.2 Irrigación.....	50
13.7.3 Caracterización microbiológica.....	51
13.8 Análisis estadístico de resultados	52
14.Resultados	52
14.1 Fase 1: Desarrollo de biopelículas.....	52
14.1.1 Microscopía láser de barrido confocal (CLSM)	52
14.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	56
14.1.3 Cinética de crecimiento	59
14.2 Aplicación de irrigantes ante biopelículas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i>	61
14.2.1 Microscopía láser de barrido confocal (CLSM)	61
14.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	64
14.2.3 Ensayo XTT.....	67
14.2.4 Cristal Violeta	71
15. Discusión	77
16. Conclusión.....	81
17. Bibliografía.....	82

Resumen

Introducción: La desinfección del sistema de conductos radiculares forma parte importante para el éxito del tratamiento mediante la eliminación de los microorganismos presentes en el conducto radicular, las soluciones irrigantes usadas actualmente y futuras deben poseer este efecto antimicrobiano además de las propiedades ideales de los irrigantes. **Objetivo:** Evaluar el efecto antimicrobiano del hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio a diferentes concentraciones en biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en dientes extraídos. **Metodología:** Se llevo a cabo la formación de biopelículas en conductos radiculares de dientes unirradiculares con *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* de manera planctónica e inter-reino a 7 y 21 días y se realizó caracterización para evaluar su formación con ensayos XTT, cristal violeta, microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de barrido confocal (CLSM), una vez conformada posteriormente se evaluaron los irrigantes: hipoclorito de sodio líquido y en gel e hipoclorito de calcio a dos concentraciones diferentes: 5.25% y 2.5% para ser observados mediante SEM y Confocal, y medidos mediante ensayos XTT y Cristal violeta. **Resultados:** La irrigación a una mayor concentración (5.25%) en los diferentes irrigantes demostró valores menores de viabilidad y biomasa en comparación con la irrigación a una concentración menor (2.5%). Las imágenes de CLSM mostraron el alcance del irrigante dentro de los túbulos dentinarios eliminando la biopelícula presente corroborado con las microfotografías de SEM donde se observaron las paredes del conducto radicular con menor presencia de biopelícula. **Conclusiones:** La concentración a la que es aplicada el irrigante es importante para un mejor resultado del tratamiento de conductos ya que se relaciona con su efecto antimicrobiano. La investigación del hipoclorito de calcio como irrigante debe ser considerado para su aplicación en el área de la odontología.

Abstract

Introduction: Disinfection of the root canal system is an important part of successful treatment by eliminating microorganisms present in the root canal; irrigant solutions used currently and in the future should have this antimicrobial effect in addition to the ideal properties of irrigants. **Objective:** To evaluate the antimicrobial effect of sodium hypochlorite and calcium hypochlorite at different concentrations on biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in extracted teeth. **Methodology:** Biofilm formation was carried out in root canals of uniradicular teeth with *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in a planktonic and inter-kingdom manner at 7 and 21 days and characterization was performed to evaluate their formation with XTT assays, crystal violet, scanning electron microscopy (SEM) and confocal scanning electron microscopy (CLSM), once formed, the irrigants were evaluated: liquid and gel sodium hypochlorite and calcium hypochlorite at two different concentrations: 5.25% and 2.5%, observed by SEM and confocal, and measured by XTT and crystal violet assays.

Results: Irrigation with a higher concentration (5.25%) of the different irrigants showed lower viability and biomass values compared to irrigation with a lower concentration (2.5%). CLSM images showed the reach of the irrigant into the dentinal tubules, eliminating the biofilm present, corroborated by SEM microphotographs where root canal walls with less biofilm presence were observed.

Conclusions: The concentration at which the irrigant is applied is important for a better outcome of root canal treatment as it is related to its antimicrobial effect. The study of calcium hypochlorite as an irrigant should be considered for its application in dentistry.

1. Introducción

El objetivo principal del tratamiento de conductos es la limpieza del conducto infectado y prevenir una reinfección de este. Una de las causas del fracaso son los microorganismos que poseen la capacidad de formar biopelículas. Por lo que el tema de irrigación y medicación del conducto radicular es tema de investigación actualmente (Ali A, 2022).

Pese a un tratamiento exitoso, existe la posibilidad del fracaso iniciando por el hecho de que nunca se logra limpiar en su totalidad por la anatomía compleja de los conductos radiculares incluyendo conductos accesorios, colaterales, laterales y delta apical, y variaciones con istmos y hendiduras (Da Silva Goulart et al., 2024).

Entre los microorganismos que mayormente se encuentran en los conductos en infecciones secundarias o persistentes es *Enterococcus faecalis* con una prevalencia de 24-80%. Debido a su capacidad de invadir los túbulos dentinarios y formar biopelículas complejas. Además de su supervivencia en pH alcalinos dentro de los túbulos dentinarios por periodos largos de tiempo (Li et al., 2020).

La presencia de esta bacteria ha generado relación con el hongo *Candida albicans* donde se presenta como levadura e hifa contribuyendo al fracaso del tratamiento y relacionando con lesiones perirradiculares (Ahmed et al., 2024).

Las soluciones irrigantes son las encargadas de desorganizar y eliminar estas biopelículas, los objetivos principales del irrigante son: eliminar las biopelículas, disolver tejido orgánico y lubricar el conducto para la instrumentación. Logrando los objetivos sin irritar los tejidos

perirradiculares. El hipoclorito de sodio sigue siendo el irrigante ideal hoy en día por sus resultados reportados más sin embargo la investigación de nuevos irrigantes sigue siendo tema de interés en el área de endodoncia (Drews, D. J. et al.,2023).

2. Marco teórico

2.1 Biopelículas

Una biopelícula es una comunidad microbiana sésil generada en una superficie y compuesta de células en una matriz extracelular polimérica autoproducida (Costerton, 2007).

En cuestión de biopelículas relacionadas a infecciones endodónticas, la morfología en cuanto al grosor de la matriz depende de la composición de la especie y aumenta con su tiempo de vida. Además de como las condiciones ambientales son un criterio importante para el desarrollo y comportamiento de la biopelícula (Siqueira, J. F.,2022).

La formación de una biopelícula se comprende en 4 etapas, iniciando por la colonización donde los microorganismos llegan a la superficie, posterior se empiezan a generar microcolonias donde se realiza la multiplicación celular, en la tercera etapa se lleva a cabo la maduración de la biopelícula donde se produce matriz celular, y por último la propagación de los microorganismos para generar mayor colonización. Las biopelículas presentan mayor resistencia a los agentes desinfectantes que los microorganismos de manera planctónica (Ye et al., 2019).

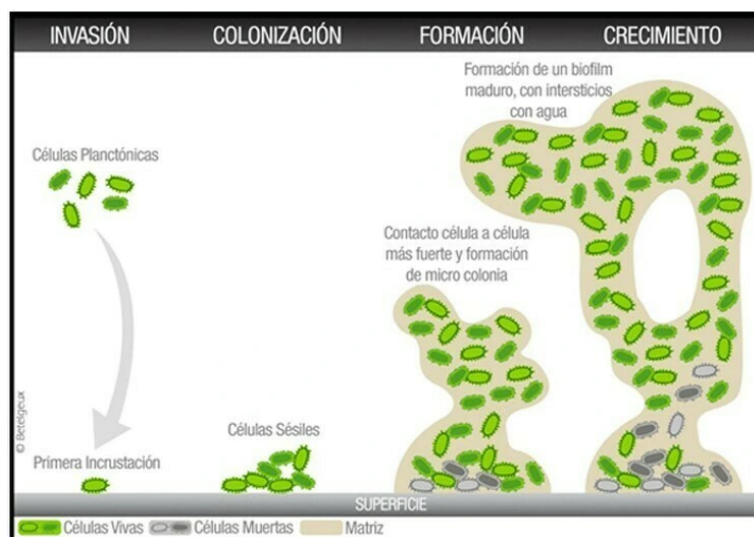


Figura 1. Formación de biopelícula (Estornell,2023)

2.1.1 Modelos *IN- VITRO* de biopelículas

Los enfoques de investigación con relación a las biopelículas formadas en la cavidad oral son diversos por eso mismo la variable de los modelos de estudios que se pueden emplear como *IN-VITRO* o *IN-VIVO*. Para la elección de un modelo de estudio es importante determinar los parámetros que se tomarán en cuenta como el conocimiento de los materiales y el modelo, facilidad de uso y el rendimiento (Zaborskyté,2022).

Técnica con placas de microtitulación (MTP)

Es uno de los sistemas *IN- VITRO* más utilizado para la investigación relacionada con biopelículas, este consta de un sistema cerrado en placas con pocillos que van desde los 6, 12, 24 y 96. Entre sus ventajas se encuentra la accesibilidad en costo y facilidad de uso, además de requerir pequeños volúmenes de reactivos en los experimentos (Coenye,2010).

El procedimiento consta de una suspensión celular en cada pocillo y se incuba con las condiciones seleccionadas, la biopelícula se formará tanto en el fondo como en las paredes (Lee, 2023).

2.2Caracterización microbiológica

El estudio de los microorganismos en diversos estudios y sus aplicaciones requiere del uso de diferentes procedimientos y equipos para su caracterización biológica mediante categorías como son morfología, fisiología, crecimiento y reproducción, patogénesis y propiedades genéticas (Pelczar, R et al.,2025).

Para llevar a cabo el estudio de los microorganismos se requiere la integración de diferentes métodos cualitativos y cuantitativos que se puede realizar en diferentes niveles respecto a su especie, género y genotipo. Con un enfoque integral y multifacético al relacionar métodos analíticos y técnicas de microscopía para su análisis morfológico (Gerardi, D.,et al 2024).

Las técnicas de caracterización se han actualizado para un mejor estudio en su crecimiento que involucran su estructura, tamaño y comportamiento con avances en tecnología e implementación de materiales para ensayos para cuantificar en estudios IN-VITRO la carga microbiana, a su vez aportan datos como presencia de proteínas y otras moléculas (Shreehari Kodakkat et al.,2024).

2.2.1 XTT

XTT es una sal de tetrazolio que las enzimas mitocondriales se reduce a formazán naranja soluble en agua, utilizado para cuantificar la actividad metabólica. El formazán es una molécula soluble que solo se une a células vivas metabólicamente activas, su absorbancia es proporcional al número de células vivas (Alonso, B et al., 2017).

Su aplicación es para evaluar la capacidad de las células activas para transformar el XTT en color amarillo soluble en agua a el color naranja de formazan que será medido mediante absorbancia en un espectrofotómetro. Este ensayo aporta ventajas al aplicarlo en estudios de biopelículas como lo son: una medición rápida, cuantificar número de células vivas, evaluar la totalidad de la biopelícula, evaluar las células que se adhieren a la dentina (Guneser & Eldeniz, 2016).

2.2.2 Cristal violeta

El ensayo de cristal violeta es utilizado para la cuantificación de biomasa de biopelículas siendo un método con alto rendimiento produciendo datos sólidos y proporcionando de igual manera información cualitativa con su tinción. Este método se lleva a cabo en microplacas de pocillos, consta de la unión del cristal violeta a moléculas cargadas negativamente así se genera una tinción tanto de las bacterias como de la matriz de la biopelícula. Tiene la capacidad de teñir las células viables como las no viables y su manera de medir es mediante absorbancia en espectrofotómetro desde los 550 nm (Amador et al., 2021).

2.3 Microscopía: principio y funcionamiento

La microscopia es el estudio de células y tejidos que podrán ser observados respecto al tamaño que presentan y por el cual se requiere instrumentos para ampliar la imagen y poder ser estudiada. Dependiendo el tipo de estudio existen microscopios aptos para cada situación como Microscopio óptico, microscopio de sonda de barrido y microscopio electrónico (Mancera, G et al.,.2024).

2.3.1 Microscopio de barrio láser confocal (CSLM)

Es un tipo de microscopia de fluorescencia debido a que proporciona una resolución de imagen y contraste mejor comparado con el microscopio óptico convencional. Las ondas de luz son la fuente de energía para la excitación de la muestra pasando a través de una abertura en un plano confocal eliminando la señal difusa fuera del foco. La muestra absorbe la energía y responde emitiendo ondas de luz largas que se registran y se convierten en imagen. Técnica avanzada de imagen óptica donde se obtienen imágenes de alta resolución y seccionamiento de muestras complejas debido a su óptica de iluminación que permite una reconstrucción 3D a partir de múltiples imágenes alineadas (Elliott AD,.2020).

Su principio se basa en capturar únicamente el campo de visión y desenfocar todo aquello fuera del plano, haciéndolos así confocales, idea inicial patentada por Marvin Minsky en 1950. Los componentes básicos son los agujeros del alfiler, detectores de ruido, lentes objetivos, filtros de longitud de onda e iluminación láser (Naweocka, A et al.,. 2021).

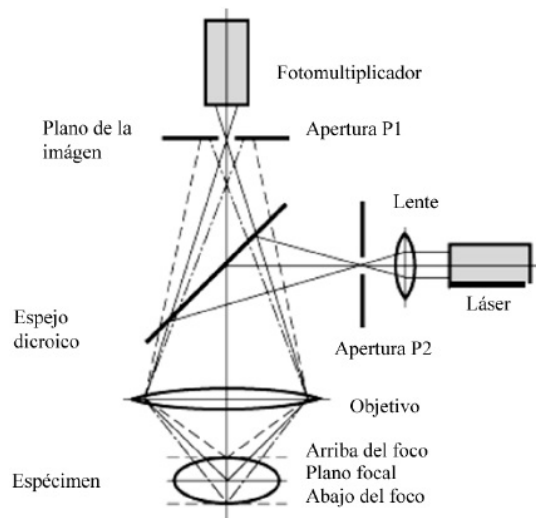


Figura 2. Funcionamiento microscopio de barrido láser confocal (Guarneros García et al., 2025)

2.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Conocido por sus siglas en inglés como SEM el microscopio electrónico de barrido este lleva su función mediante un patrón rasterizado, los electrones no solo pasan por la muestra, sino que se reflejan en la superficie a estudiar o incluso ionizan átomos dentro de la muestra liberando electrones que ayudarán a formar la imagen final reconstruyendo tridimensionalmente la superficie (Egerton, 2011).

Esto se lleva a cabo mediante un barrido de la superficie de la muestra, por medio de un haz de electrones cuyo diámetro es disminuido (4 nm y 200 nm), con lentes electromagnéticos formadas por el paso de corriente a través de solenoides. Interacciona con la muestra, generando señales las cuales son recopiladas por un detector específico para cada una (*Scanning Electron Microscopy | Principles Of Scanning Electron Microscopy | Thermo Fisher Scientific - US*, s. f.).

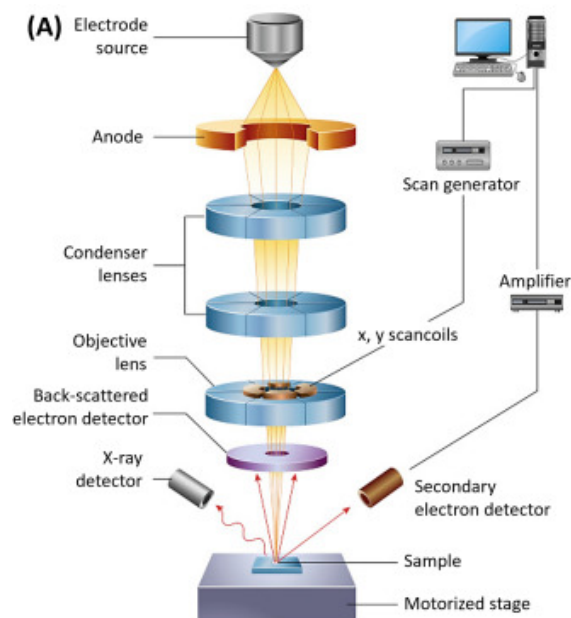


Figura 3. Funcionamiento microscopio electrónico de barrido (Shreehari Kodakkat et al., 2024).

2.4 Infecciones endodónticas

Las infecciones endodónticas son causadas por microorganismos, en su mayor parte bacterias, que se encuentran en los conductos radiculares del diente afectado. El microbiota dentro del sistema de conductos radiculares es el factor que determina la patogénesis de las lesiones periapicales (Xu et al., 2020).

Estas infecciones pueden ser intrarradiculares o extrarradiculares, las infecciones endodónticas intrarradiculares se dividen en tres respecto al momento en que los microorganismos ingresan al sistema de conductos radiculares: primarias, los microorganismos invaden y colonizan la pulpa principalmente bacterias anaeróbicas donde destaca *Prevotella* (23,5%); secundaria donde los microorganismos ingresan posterior a una intervención donde destacan las *Fusobacterium*

(18,4%), y las persistentes donde éstos mismos microorganismos se vuelven más resistentes. Dentro de estas infecciones se pueden detectar 15 filos, 29 clases, 47 órdenes, 85 familias, 160 géneros y 368 especies. Donde predominan *Prevotella*, *Porfiromonas*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Lactobacilos*, *Parviromonas*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Actinomyces* (Keskin et al., 2017).

Existe una persistencia de *Streptococcus*, *Parvimonas*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*. Entre los principales gram positivos que generan resistencia posterior al procedimiento químico-mecánico (Nardello et al., 2022).

El desbridamiento mecánico reduce la carga bacteriana, más, sin embargo, no la erradica. Para lograr una reducción intrarradicular es necesario el empleo de diferentes irrigantes y técnicas de desinfección. En casos de necrosis pulpar existe la presencia de microorganismos anaerobios y microorganismos aerobios en un 60% de los casos, *Streptococcus* en un 85%, y gram negativos *bacilos* en un 15% de los casos. Bacterias gram positivas, como *Streptococcus* y *Enterococcus faecalis*, son las responsables de la mayor cantidad de fracasos endodónticos. Las infecciones del conducto radicular y las apariciones recurrentes de periodontitis apical se han relacionado a la presencia de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Xu et al., 2019).

2.5 Fracaso del tratamiento de conductos

La terapia de conductos radiculares puede fracasar esto debido a que no se realizó una correcta desinfección o bien sucede una recontaminación del conducto por una restauración mal adaptada o la falta de ella. Los microorganismos que pese a una desinfección sobreviven generan una biopelícula que posee mejor tolerancia al entorno y a la medicación intraconducto (Du et al., 2021).

Dicho fracaso puede ser prevenido o disminuir la probabilidad de que suceda desde el procedimiento, realizando un buen diagnóstico, un aislamiento correcto, la preparación del acceso e identificación y ubicación de los conductos, correcta longitud de trabajo y adecuada obturación (Keskin et al. 2017).

2.6 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis, coccus anaerobio facultativo gram positivo, considerado por sus cepas persistentes, puede crecer en un medio con diferentes temperaturas entre 5 y 50° C y pH hasta 9,6 (Daca & Jarzembowski, 2024). Puede sobrevivir a condiciones difíciles y soportar una alimentación inadecuada, con la capacidad de formar biopelículas complejas (Yavagal et al., 2023).

Es una especie que presenta resistencia a la fagocitosis y a los antimicrobianos en comparación con otros microorganismos debido a su resiliencia. Se ha encontrado en casos de retratamiento o infecciones endodónticas secundarias con prevalencia de 24 a 80% dentro de la presencia de bacterias (Li et al., 2020).

Tiene la capacidad de formar una biopelícula donde tiene la disposición de modular la respuesta inmune del huésped y generar macromoléculas virulentas que conllevan a la destrucción del tejido periapical (Du et al., 2021).

2.7 *Candida albicans*

Candida albicans es un patógeno fúngico presente en las infecciones endodónticas persistentes (Pauletto et al., 2024), un hongo dimórfico con forma de levadura e hifas, que en condiciones específicas contribuye al fracaso del tratamiento de conductos (Ahmed et al., 2024). Identificado como la especie de *candida* con mayor predominio del microbiota oral, debido a su virulencia superior a otras especies por sus propiedades como la adhesión tenaz a la superficie y su capacidad de formar biopelículas, producción de enzimas hidrolíticas, fosfolipasas, proteinasas y hemolisinas. Generando así la habilidad de adaptabilidad ambiental para evadir las defensas del huésped (Abraham et al., 2020).

2.8 Biopelícula du-especie inter-reino

La interacción entre bacterias y hongos en una biopelícula tiene cada vez mayor evidencia en estudios de enfermedades infecciosas orales. La coexistencia de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en los conductos radiculares y penetrando en los túbulos dentinarios donde *Enterococcus faecalis* se adhiere a la *Candida albicans* en forma de levadura como en hifa presenciando los beneficios que les otorga

Candida albicans a la supervivencia de *Enterococcus faecalis* (Du et al., 2021).

La coexistencia de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* dentro del conducto radicular invadiendo los túbulos dentinarios ha sido reportada en casos de fracaso del tratamiento de conductos, corroborando que generan una biopelícula más densa y gruesa, que debido a su propiedad se vuelve más tolerante a la alcalinidad e inanición, así como resistente al ser expuesta a productos antimicrobianos. *Candida albicans* se encarga de mejorar el medio para que *Enterococcus faecalis* pueda adherirse a las paredes dentinarias. Así al establecerse llegan a generar una mayor reabsorción ósea periapical con niveles altos de citoquinas inflamatorias (Ornuma Srihawan et al., 2024).

2.9 Limpieza y desinfección del sistema de conductos radiculares

La limpieza y desinfección completa del sistema de conductos radiculares se consideran obligatorias para el éxito a largo plazo del tratamiento de conductos, pero a pesar de una irrigación exhaustiva después de una limpieza mecánica, el tejido pulpar residual, las bacterias y los restos de dentina pueden permanecer en el sistema de conductos radiculares hasta en un 30%. El uso de irrigantes en el tratamiento de conductos toma un papel vital debido a que es la manera de desinfectar áreas del conducto radicular que no han sido tocadas durante la instrumentación mecánica (Xu et al., 2020).

2.10 Irrigantes

Uno de los objetivos del tratamiento de conductos es lograr una desinfección y prevenir una reinfección, la instrumentación sin irrigación logra mecánicamente reducir el microbiota, sin embargo, la morfología compleja donde se presentan conductos accesorios, laterales, istmos o deltas apicales generan una dificultad para una limpieza únicamente mecánica, es por ello por lo que el uso de irrigantes es indispensable para una limpieza químico-mecánica. La irrigación tiene dos objetivos uno físico y uno químico, el físico consta de impulsar el irrigante a través del sistema de conductos radicular para generar un desbridamiento y el químico que se refiere a la irrupción de la biopelícula, inactivando endotoxinas y disolviendo tejido orgánico (Gomes, B. P. F. A. et al.,2023).

Los irrigantes más utilizados para la desinfección de los conductos radiculares son hipoclorito de sodio (NaClO), etilendiaminotetraacético (EDTA), clorhexidina (CHX) y solución salina al 0,9%.

Las propiedades deseables de las distintas soluciones irrigantes son:

- Germinicida y fungicida.
- Estabilidad en solución.
- Efecto antimicrobiano.
- No ser inactivado ante líquidos como sangre, suero y proteicos del tejido.
- Poseer una tensión superficial baja.
- Capacidad de eliminar barrillo dentinario y desinfectar dentina subyacente.
- Aplicación rápida.

- Disolución de tejido necrótico y vital.
- Económico.
- Practicidad.

Las propiedades no deseadas son:

- Irritación de los tejidos periapicales.
- Interferir en la reparación de los tejidos periapicales.
- Pigmentante.
- Antigénico.
- Tóxico para células tisulares del diente.
- Carcinógeno.
- Interacciones indeseables con otras soluciones y materiales de irrigación endodóntica (Berman, L et al.,2022).

2.10.1 Hipoclorito de sodio

El Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5.25% considerado el estándar de oro, es la solución irrigante más utilizada en endodoncia, un líquido claro color amarillento y con un olor característico. Que ante la presencia de luz se degrada y es soluble en agua (Ali A, et al.,2022).

Entre sus ventajas predomina como agente antibacteriano y proteolítico, poseyendo la capacidad de disolver tejido orgánico. Pese a sus ventajas, es importante el conocer los inconvenientes como lo son su toxicidad, corrosivo, olor desagradable y la decoloración que ocasiona. Por lo tanto, se recomienda su uso en concentraciones entre 2.5 a 6% del irrigantes. Debido a que su mecanismo de acción provoca alteraciones biosintéticas en el metabolismo celular y destrucción de fosfolípidos, formación de cloraminas que interfieren en el metabolismo

celular, acción oxidativa con inactivación enzimática irreversible de bacterias y degradación de lípidos y ácidos grasos (Drews et al., 2023). Mediante el proceso de gelificación se logra la consistencia del hipoclorito de sodio en gel al 5.25%, donde se agregan gelificantes a una solución caliente de hipoclorito de sodio. Estos gelificantes tienden a autoensamblarse mediante la formación de enlaces H, pero se rompen rápidamente debido a las altas temperaturas. Tiene las mismas características y propiedades del hipoclorito de sodio en consistencia líquida, sin embargo, existe menor riesgo de extrusión apical de la solución (Kotecha et al., 2023).

2.10.2 Hipoclorito de calcio

El hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) al 65%, también llamado cal clorada o sal de calcio de ácido hipocloroso es un polvo granular blanco con mayor porcentaje de cloro (70%), tiene un pH de 11.5 y se descompone a una temperatura de 100°C . El hipoclorito de calcio es alguicida y bactericida, por sus propiedades es aplicado en la purificación de agua potable y desinfección de aguas de piscinas. Presenta mejor estabilidad química, que posee una acción microbiana y capacidad de disolver tejidos orgánicos similar al NaClO , y que tiene menor capacidad de inducir alteraciones estructurales en la dentina (De Pellegrin et al., 2023).

Por su parte el hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) ha demostrado tener mayor cantidad de iones de cloro utilizables en comparación con el hipoclorito de sodio, lo que a su vez le daba una mayor capacidad de disolver tejido orgánico. Por tales ventajas ha sido estudiado tanto en

su efecto antimicrobiano como citotóxico donde se mostraron resultados positivos en cuanto a viabilidad celular y una respuesta inflamatoria menor en comparación con el hipoclorito de sodio (Ozturk et al., 2024).

3. Antecedentes

Ahmed et al. (2024), mediante un estudio *IN-VITRO* con dientes tratados endodónticamente, enfatizó el hecho de la persistencia de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* dentro del sistema de conductos radiculares.

Kotecha et al. (2023), evaluó la eficacia del hipoclorito de sodio en gel y en solución líquida en la desinfección del sistema de conductos radiculares en dientes diagnosticados con necrosis pulpar y periodontitis apical, determinando que ambos presentan eficacia antimicrobiana generando una desinfección efectiva. Así mismo, Arruda-Vasconcelos et al. (2022) en un estudio evaluando la eficacia del hipoclorito de sodio al 6% en dientes diagnosticados con pulpitis irreversible sintomática donde se detectaron 260 cepas inicialmente y 215 al término de este, las especies más significativas fueron: *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Treponema*.

Dumani et al. (2019) en una muestra de 105 dientes infectados con *Enterococcus faecalis* al irrigar con hipoclorito de calcio al 2.5% encontró una reducción bactericida significativa dentro del conducto radicular.

4. Planteamiento del problema

El éxito del tratamiento de conductos no quirúrgico aborda un 90%, pese a esta cifra el 10% restante entra dentro del porcentaje de dientes que posteriormente son retratados o extraídos (Sonntag, 2010), existen diferentes causas del porque la terapia de conductos fracasa entre ellas destacan un diagnóstico erróneo, una deficiente preparación biomecánica acompañada de baja irrigación, falla en la obturación y una inadecuada rehabilitación final.

En estudios recientes se menciona que, pese a una preparación químico-mecánica, aún existe la presencia de bacterias dentro de los túbulos dentinarios, obteniendo una desinfección imparcial del sistema de conductos radiculares ante la resistencia y persistencia de las bacterias de *Enterococcus faecalis* y el hongo *Candida albicans*.

La presencia de *Enterococcus faecalis* en raíces obturadas puede llegar incluso hasta un 70%, pese que la bacteria tiene que sobrevivir a la acción de agentes antimicrobianos al momento de la irrigación, posee la habilidad de colonizar los túbulos dentinarios lo que complica su eliminación ya que el irrigante en ocasiones no entra a todos los sitios como lo son zonas del istmo, conductos en C, y conductos accesorios. La presencia de *Candida albicans* en el conducto radicular puede deberse a que esta se encuentra en forma comensal en la cavidad oral, poseen diversos factores de virulencia que aumentan su resistencia pese a un tratamiento, su presencia va desde el 0,5% hasta el 55%.

Las bacterias cuando se enfrentan a un agente adverso generan una respuesta de estrés que les permite soportar la amenaza, sobrevivir y

recuperarse. Lo que lleva a realizar un retratamiento del diente tratado bajando así su tasa de éxito a un 74 %.

Por dicho motivo el uso del irrigante ideal a una óptima concentración es necesario para eliminar la mayor cantidad posible de bacterias y hongos presentes, tomando además las características propias del irrigante utilizado, así como la reacción de los tejidos perirradiculares al tener alguna cercanía con él.

El hipoclorito de sodio (NaClO) que es el irrigante actual más utilizado por presentar propiedades bactericidas y germicidas, pese a eso la literatura ha abarcado cuestionamientos acerca de que a qué concentración debe ser empleado desde porcentajes de 0.25% hasta 5.25% para que por una parte llevar a cabo sus propiedades antimicrobianas, pero a su vez no genere daño en el tejido perirradicular y terribles consecuencias en caso de extrusión que podrían generar necrosis tisular.

Además de tomar en cuenta la concentración correcta, existen las cuestiones de cuánto irrigante se debe emplear y por cuánto tiempo para lograr mayor desinfección, y cómo potencializar el uso del irrigante.

5. Pregunta de investigación

¿Cuál irrigante entre hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio y en qué concentración tiene mejor efecto antimicrobiano ante *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en biopelículas inter-reino en dientes extraídos?

6. Justificación

El presente trabajo de investigación se enfoca en evaluar mediante un estudio *IN- VITRO* dos irrigantes: hipoclorito de sodio (NaClO) líquido, hipoclorito de sodio en consistencia gel e hipoclorito de calcio (Ca (ClO)₂) a dos concentraciones diferentes para identificar su efectividad antimicrobiana ante una biopelícula creada a partir de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Con la finalidad de determinar cuál concentración tiene mejor efecto frente a estas bacterias y hongos presentes en el sistema de conductos radiculares para así ayudar en la toma de decisiones al momento de elegir un protocolo de irrigación.

Mediante este estudio se busca mediante ensayos cuantitativos y observaciones microscópicas analizar cómo actúa el irrigante en el conducto radicular para cuantificar cuanta biopelícula sigue presente posterior a una intervención químico mecánica, con la intención de comparar un irrigante utilizado ampliamente hoy en día y otro que recientemente es mencionado, con el fin de aportar conocimiento sobre este nuevo irrigante y sus propiedades, además de corroborar si la concentración y presentación en la que es aplicada el irrigante es viable para lograr el éxito de la desinfección del conducto radicular.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano del hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio a diferentes concentraciones en biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en dientes extraídos.

7.2 Objetivos específicos

1. Crear y analizar la formación de biopelículas de bacterias *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* dentro del conducto radicular de dientes premolares unirradiculares extraídos.
2. Determinar la eficacia del agente irrigante.
3. Comparar el efecto antimicrobiano del hipoclorito de sodio líquido vs. gel, y el hipoclorito de calcio a diferentes concentraciones.
4. Analizar la resistencia de las bacterias dentro del conducto radicular de dientes extraídos al ser expuestas a diferentes concentraciones del irrigante.

8. Hipótesis

El irrigante a mayor concentración al ser empleado en el conducto radicular tendrá mejor efecto antimicrobiano frente a la biopelícula creada en dientes extraídos. Asimismo, el irrigante en consistencia líquida logrará irrumpir fácilmente la biopelícula en comparación con una consistencia en gel.

9. Diseño metodológico

Tipo de estudio: Experimental *IN-VITRO*

Universo de estudio: 140 Dientes premolares unirradiculares extraídos de la clínica de odontología de la ENES León, UNAM con biopelículas conformada por *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* creada dentro del conducto radicular.

Tipo y tamaño de muestra: Cinco repeticiones, Tres experimentos independientes n=15

Espacio y tiempo: Laboratorio de investigación Multidisciplinaria de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM agosto 2024- marzo 2025.

10. Variables

Tabla 1. Variables independientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Hipoclorito de sodio	Es un compuesto químico inorgánico ampliamente utilizado por sus propiedades desinfectantes, oxidantes y blanqueadoras. Se presenta comúnmente en forma de una solución acuosa de color amarillo verdoso y se caracteriza por su olor penetrante a cloro (Amoquimicos, s. f.).	Compuesto químico, considerado el estándar de oro de la irrigación en endodoncia.	Cualitativa Nominal
Hipoclorito de calcio	También llamado "cal clorada" es un compuesto químico cuya fórmula es $\text{Ca}(\text{ClO})_2$. Es ampliamente utilizado en tratamiento de aguas por su alta eficacia contra bacterias, algas, moho, hongos y microorganismos peligrosos para la salud humana	Compuesto químico empleado en desinfección.	Cualitativa Nominal

	(Amoquimicos, s. f.-b).		
Concentración	Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen, y cuya unidad en sistema internacional es el mol por metro cúbico (mol/m^3) (RAE, s. f.).	Concentración del irrigante empleado 1. Hipoclorito de sodio líquido 5.25% 2. Hipoclorito de sodio en gel 5.25% 3. Hipoclorito de calcio 5.25% 4. Hipoclorito de sodio líquido 2.5% 5. Hipoclorito de sodio en gel 2.5% 6. Hipoclorito de calcio 2.5%	Cuantitativa Continua
Biopelícula	Una biopelícula, tapiz bacteriano o tapete microbiano es un ecosistema microbiano organizado, conformado por una o varias especies de microorganismos asociados a una	Biopelícula conformada por los microorganismos <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i> .	Cualitativa Nominal

	superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas (Biopelícula > Información, Biografía, Archivo, Historia., s. f.).		
Cantidad de irrigante	Porción de una magnitud líquida en estado de agregación de la materia en forma de fluido altamente incompresible, lo que significa que su volumen es casi constante en un rango grande de presión (RAE, s. f.).	Mililitros utilizados para la irrigación del conducto radicular 20ml	Cuantitativa Discreta

Tabla 2. Variables dependientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Efectividad del irrigante	Capacidad de lograr el efecto que se desea o se espera (RAE, s. f.).	Capacidad del irrigante de eliminar la biopelícula creada.	Cualitativa Nominal
Reducción de biomasa de biopelícula	La biomasa es el conjunto de la materia orgánica, de	Cantidad de biomasa presente dentro del	Cuantitativa Continua

	origen vegetal o animal, y los materiales que proceden de su transformación natural o artificial (Biomasa IDAE, s. f.).	conducto radicular antes y posterior a la irrigación Cuantificado por Cristal Violeta.	
Viabilidad celular de la biopelícula	Es la medición del número de células vivas en una muestra, generalmente dada como una proporción de la población celular total. Es un parámetro crítico para medir al evaluar la salud de cualquier cultivo celular o el resultado de un ensayo (Salud Celular: Viabilidad, Proliferación, Citotoxicidad y Función Celular, s. f.).	Cuantificación de células vivas dentro del conducto radicular, medido a través de XTT.	Cuantitativa Continua
Morfología de la biopelícula	Disposición o modo de estar relacionadas las distintas partes de un conjunto (RAE, s. f.).	Microfotografías de la estructura dentro del conducto radicular obtenidas por los microscopios de SEM y Confocal.	Cualitativa Nominal

11. Criterios de selección

11.1 Criterios de inclusión

- Dientes unirradiculares.
- Dientes con una longitud radicular de 13 mm o más.
- Dientes con conducto radicular único.
- Dientes con formación de biopelícula.

11.2 Criterios de exclusión

- Dientes fracturados.
- Dientes con curvaturas mayores a 30°.
- Dientes deshidratados.
- Dientes con dentina radicular afectada.
- Dientes calcificados.

11.3 Criterios de eliminación

- Dientes en los que no se genere una biopelícula.
- Dientes que se fracturen o fisuren durante el experimento.

12. Material y equipo

Para los ensayos hechos durante el proyecto se utilizaron equipos como: cámara de flujo, micropipeta 1-10 μL , 10-200 μL y 200-1000 μL , incubadora de humedad relativa (MIDI 40 CO₂ Thermo Scientific), microcentrifugadora (ThermoFisher Fresco17), microscopio confocal (Zeiss LSM 780), microscopio electrónico de barrido (SEM; JSM 6060LV JEOL), espectrofotómetro (Thermo Scientific).

13. Metodología

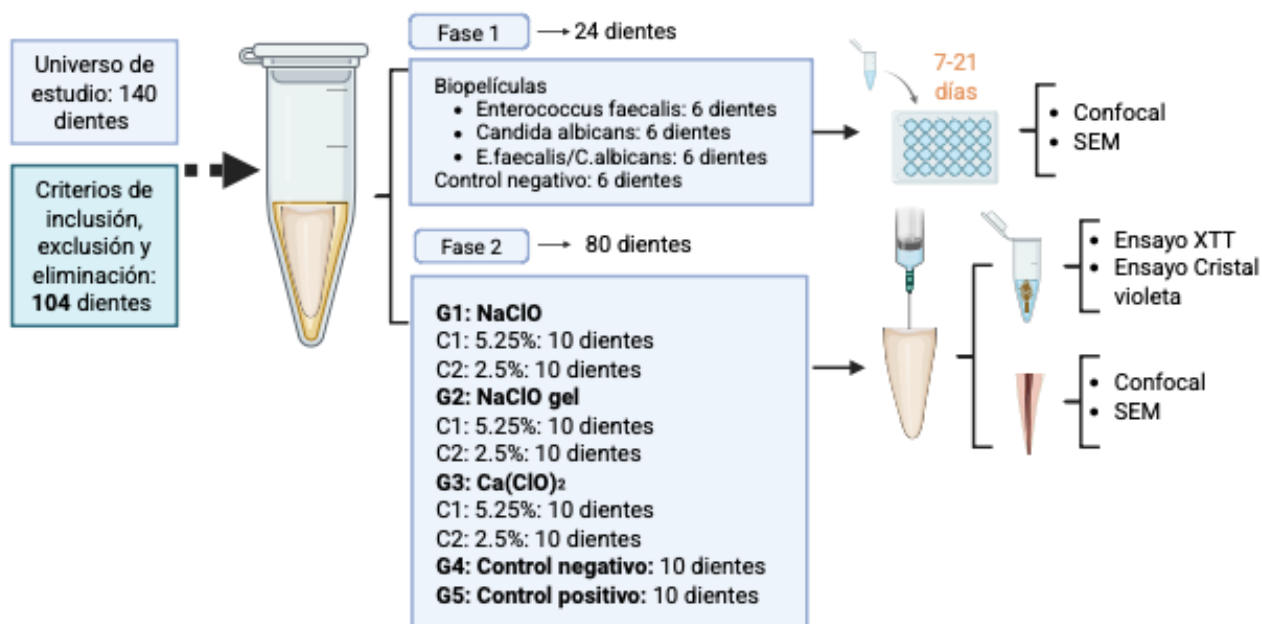


Figura 4. Esquema del proceso metodológico del experimento *IN-VITRO* en fase 1: formación de biopelículas y fase 2: protocolo de irrigación.

13.1 Preparación de la muestra

Se recolectaron 104 dientes extraídos unirradiculares con las características de inclusión mencionadas para este estudio (24 dientes para evaluación de la formación de la biopelícula y 80 dientes para el protocolo de irrigación), se realizó un curetaje para eliminar restos de residuos, cálculo o tejido que se encontrarán en la superficie radicular. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada, se realizó una marca con plumón indeleble a una longitud de 13 mm medida con vernier

digital (Insize), se decoronaron con pieza de baja velocidad (Anelsam) con un disco de diamante con micromotor bajo enfriamiento con agua destilada, estandarizando la longitud de las raíces a 13 mm. Después de la preparación de la cavidad de acceso, se permearon los conductos utilizando una lima K manual de calibre n.º 10 (Dentply), los conductos se irrigaron con 5 ml de solución salina. El foramen apical se selló con cemento de ionómero de vidrio autopolimerizable (IOV) (3M) y la superficie radicular se selló con dos capas de esmalte para uñas. Para realizar estandarización del área apical se optó por instrumentar hasta una lima 25/.04 con sistema rotatorio Race Evo (FKG) irrigando con solución salina y se mantuvieron hidratados en agua destilada.

Previo a la primera etapa: formación de biopelícula los 24 dientes empleados se sometieron a una irrigación previa para asegurar que el conducto se encontrará limpio utilizando 5 ml de hipoclorito de sodio al 5.25% (NaClO), 5 ml de solución fisiológica, 2 ml de EDTA y finalmente 5 ml de solución fisiológica. Se colocaron en agua destilada 10 minutos, secando el conducto con puntas de papel, y llevados a tubos para microcentrífuga de 1.5ml colocando 500 microlitros de medio BHI y autoclavándolos durante 20 min a 121°C.

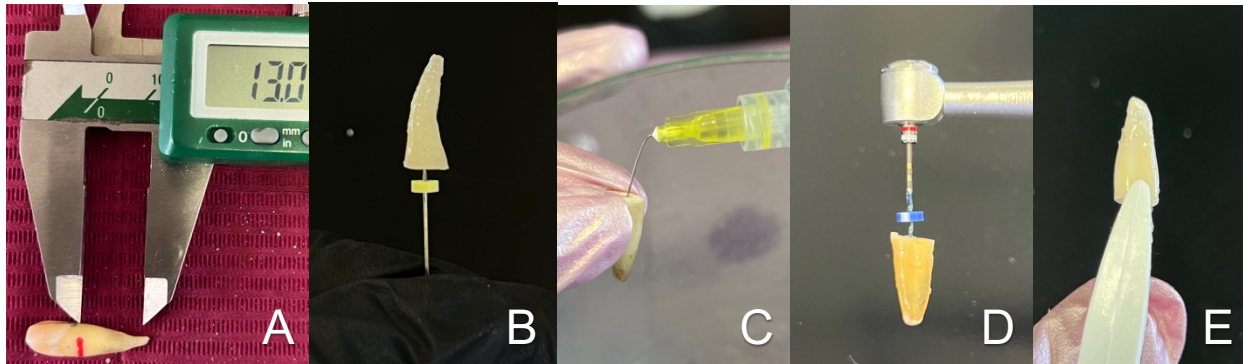


Figura 5. Preparación de los dientes. A) Estandarización con vernier B) Permeabilidad C) Irrigación con solución fisiológica D) Instrumentación E) Colocación de barniz y IOV.

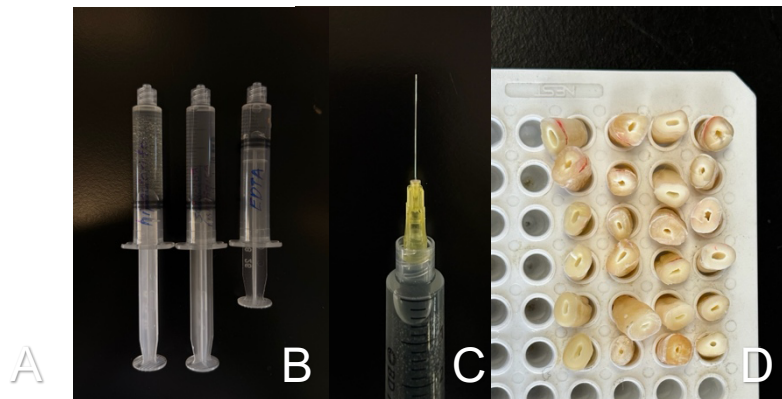


Figura 6. A) Dientes posterior a preparación. B) Soluciones irrigantes. C) Punta endo eze empleada. D) Dientes preparados para inoculación biopelícula.

13.2 Fase 1: Desarrollo de biopelículas

13.2.1 Cepas clínicas

El inóculo de los microorganismos *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 90028 en estado planctónico se preparó a partir de una mezcla de suspensiones microbianas, ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por ml para cada microorganismo).

Se realizaron cultivos jóvenes de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en platos de agar de su respectivo medio Mueller-Hinton y Dextrosa Sabouraud y se incubaron durante 24 horas. Para la inoculación, se realizó overnight colocando de 3 a 5 colonias del cultivo joven e incubando por 18 horas. Con el overnight realizado se realizó suspensiones de ambos microorganismos en escala 0.5 McFarland.

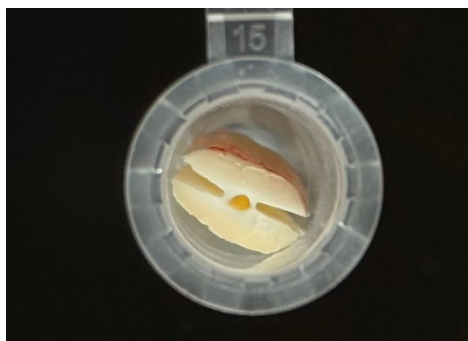


Figura 7. Raíz de diente en los tubos para microcentrífuga previo a inoculación.

13.2.2 Inoculación de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* de manera planctónica y biopelículas independientes

Los dientes previamente estériles en tubos para microcentrífuga ya con el medio BHI, se dividió en los siguientes grupos:

- Biopelícula de *Enterococcus faecalis*: 6 dientes
- Biopelícula de *Candida albicans*: 6 dientes
- Biopelícula de *Enterococcus faecalis*/ *Candida albicans*: 6 dientes
- Grupo control negativo: 6 dientes

Las suspensiones de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 90028 y la fusión de ambas fueron llevados dentro del conducto radicular dentro de una campana de flujo laminar. Inicialmente se colocaron 50 μ L y se centrifugó en microcentrifugadora (ThermoFisher Fresco17) a 5600 rpm y 7300 rpm durante 5 minutos colocando solución fresca. Se incubó a 37°C durante 21 días, realizando cambio de medio cada 24 horas.



B

Figura 8. A) Diente inoculado con medio a nivel de la altura del diente (Día 1). B) Grupos en tubos para microcentrífuga.

13.3 Ensayo XTT

El ensayo con XTT sal de sodio X4626 también conocida como sal de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida, sal interna de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (Sigma-Aldrich) para cuantificar por colorimetría el número de células vivas y la absorbancia de estas. Se utilizó un diente de cada grupo, se retiraron dichos dientes de los tubos para microcentrífuga y fueron lavados dos veces con disolución salina tamponada con fosfato PBS (Sigma-Aldrich). En tubos para microcentrífuga de 2 ml fue colocado 1ml de medio Brain Heart Infusion (BHI) colocando en diente en su interior para posterior con lima U no.25 sonificando con ultrasonido (NSK) dentro del conducto para desprender la biopelícula y posterior se le dio vortex 1 min para lograr desprender la biopelícula en su totalidad.

Por último, en cajas de 96 pocillos fueron colocados 50 μ L de la suspensión generada y 50 μ L de XTT y se incubó a 37°C durante 4 hrs para dar lectura.

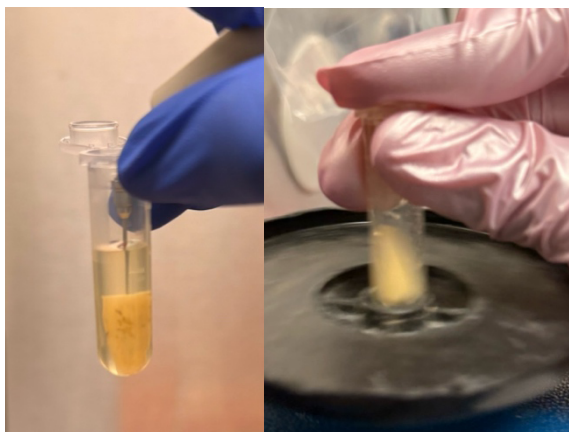


Figura 9. Preparación del diente previo a ensayo XTT.

13.4 Ensayo Cristal Violeta

Para cuantificar la cantidad de biopelícula formada los tubos para microcentrífuga fueron colocados en centrifugadora a 7000 rpm durante 10 minutos para generar un sedimento celular, posteriormente fue retirado el medio y colocados 600 μ L de metanol al 100% resuspendiendo para fijar y fueron colocados en caja de 24 pozos empleando 2 pozos por muestra colocando 300 μ L en cada pozo durante 40 min, se aspiró el metanol para posterior colocar 600 μ L de cristal violeta 0,1% (w/v) (Sigma-Aldrich) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, se aspiró para ser lavado con disolución salina tamponada con fosfato PBS (Sigma-Aldrich) dos veces y se colocó ácido acético al 33% y se dejó reposar durante 5 minutos para dar lectura en espectrofotómetro a 590nm y 620nm.

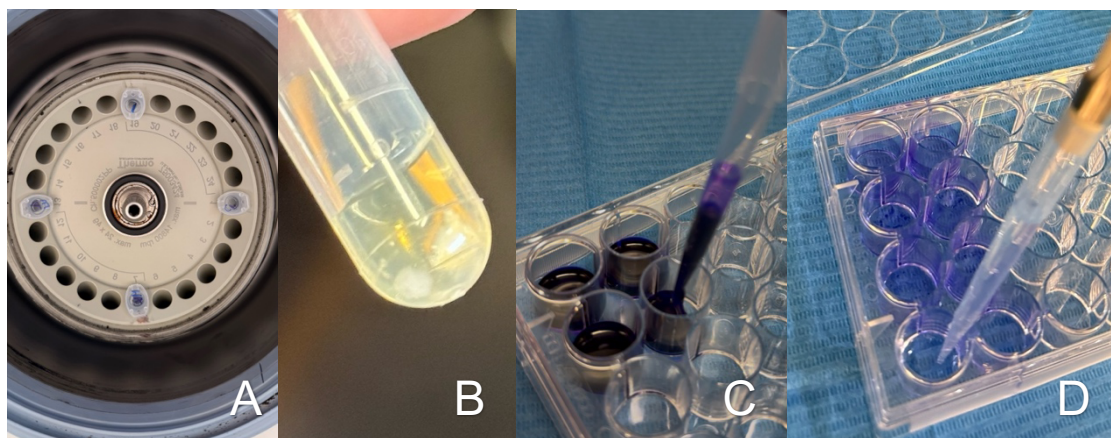


Figura 10. Proceso para cristal violeta: A) centrifugación para generación de B) sedimento celular, C) aplicación de cristal violeta y D) colocación de ácido acético.

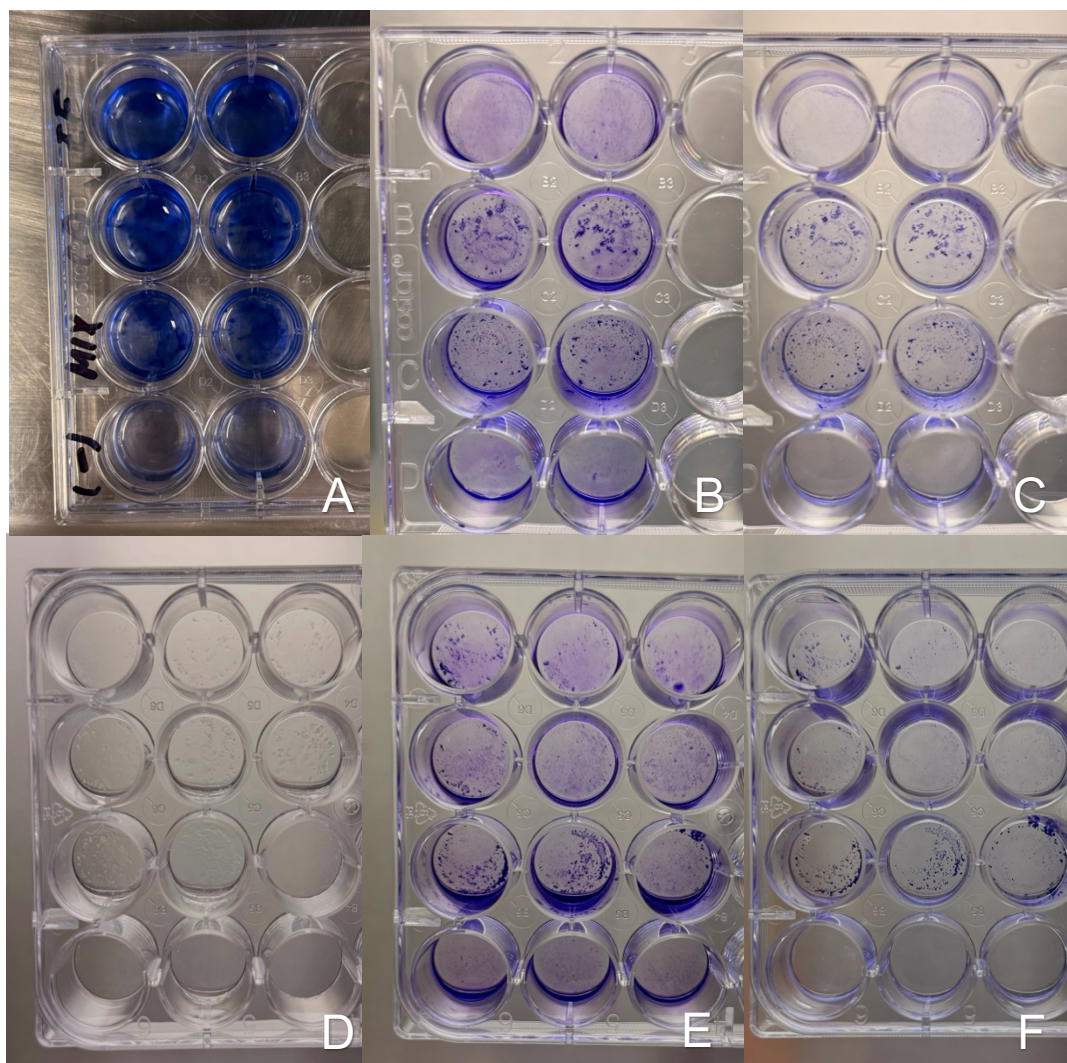


Figura 11. Biopelícula en la caja de 24 pozos en día 7 de formación y día 21 de formación.

13.5 Microscopía láser de barrido confocal (CLSM)

Las biopelículas de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* y la combinación de ambos se tiñeron con 10 µl de colorante BacLight TM LIVE / DEAD® preparado en 990 µL de agua destilada esterilizada en una mezcla de 5 µl de colorante de ácido nucleico fluorescente verde SYTO® 9 y 5 µl de fluorescente rojo tinción con ácido nucleico, yoduro de propidio durante 5 min antes de la obtención de imagen por CLSM en microscopio confocal (Zeiss LSM 780). Se observaron las muestras a un aumento de lente de 40x a tamaño de paso de 0.21 µm, a formato de 212.3 µm x 212.3 µm proyectando el láser verde a 490-520 nm y el láser rojo a 560-610 nm.

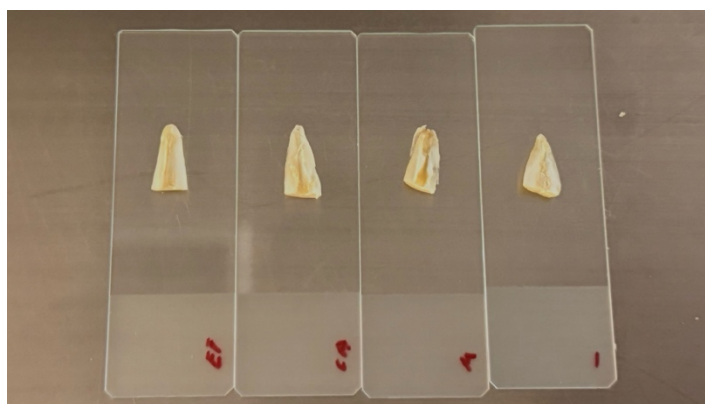


Figura 12. División de la muestra para ser teñida y observada.

13.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En el día 7 y 21 de formación de la biopelícula dentro del conducto radicular, una muestra por grupo fue preparada previo a ser observada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM; JSM 6060LV JEOL). Se realizó un corte longitudinal a las raíces con micromotor y disco de diamante de baja velocidad estériles para obtener dos mitades, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% durante 48 horas, fueron deshidratadas con etanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 95% y 100%) colocando 5 minutos cada uno, para finalizar se realizó secado a punto crítico, recubrimiento con pulverización de oro durante 3 minutos para realizar observaciones con un aumento de 2500x, 5000x y 10000x.

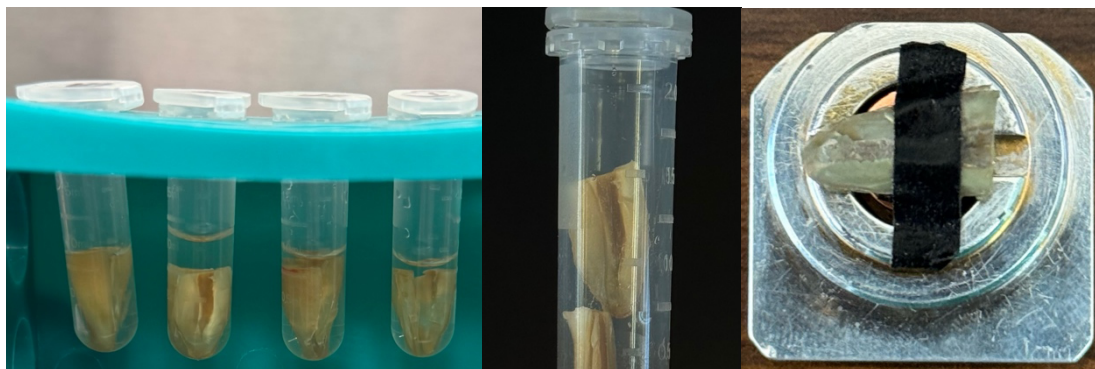


Figura 13. Preparación de las muestras mediante proceso de fijación y deshidratación.

13.7 Fase 2: Protocolo de irrigación

Posterior al periodo de la formación de la biopelícula inter-reino dentro del conducto radicular confirmada con la caracterización microbiológica, 80 raíces fueron divididas en cinco grupos de irrigación y grupos control (G), cada grupo de irrigación subdividido por concentración (C).

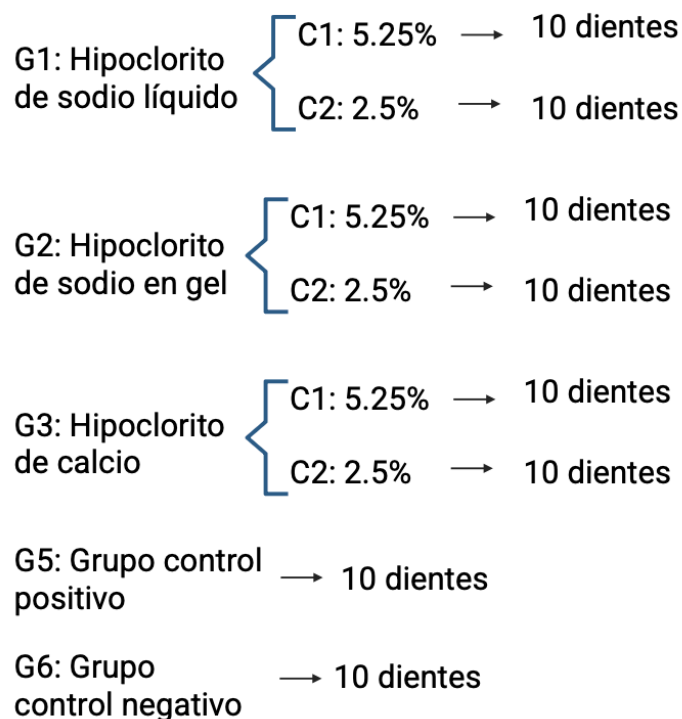


Figura 14. Esquema de división de la muestra para fase 2.

13.7.1 Cepas clínicas

El inóculo de los microorganismos *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 90028 se realizó de igual manera utilizando los mismos parámetros como en la primera fase donde se evaluó la formación de las biopelículas.

Se realizaron cultivos jóvenes de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 90028 en platos de agar de su respectivo medio Mueller-Hinton y Dextrosa Sabouraud y se incubaron durante 24 hrs. Para la inoculación, se realizaron overnight colocando de 3 a 5 colonias del cultivo joven e incubando por 18 hrs. Con el overnight obtenido se realizó suspensiones de ambos microorganismos con escala 0.5 McFarland.

Las suspensiones de ambos microorganismos fueron llevadas dentro del conducto radicular dentro de una campana de flujo laminar, colocando inicialmente 50 μ L y se centrifugó en centrifugadora (ThermoFisher Fresco17) a 2400 rpm por 2 minutos, posterior se colocó 50 μ L de solución fresca y se centrifugó a 4200 rpm por 2 minutos. Se incubó a 37°C durante 21 días, realizando cambio de medio cada 24 hrs.

13.7.2 Irrigación

Posterior a los 21 días de formación de biopelícula se retiró el medio a cada tubo de microcentrífuga y se lavó dos veces con PBS (Sigma-Aldrich). Con gasa estéril se tomó los dientes en tercio medio para ser

irrigados con el irrigante correspondiente. Cada diente fue irrigado con 20ml de la solución irrigante (hipoclorito de sodio, hipoclorito de sodio en gel e hipoclorito de calcio) con aguja endo-eze y a su vez instrumentado con sistema rotatorio Race Evo (FKG) con limas 25/.04 y 30/.04 para posteriormente ser secado el conducto con puntas de papel número 35 (Hygienic). Fue llevado a un nuevo tubo de microcentrífuga estéril con 300 μ L de medio BHI para realizar la caracterización microbiológica.



Figura 15. Irrigación del diente con hipoclorito de sodio.

13.7.3 Caracterización microbiológica

Se realizaron las pruebas de ensayo XTT, cristal violeta (**Figura 11**), obtención de imágenes con microscopía láser de barrido confocal y microscopía electrónica de barrido realizando las pruebas con los mismos parámetros detallados anteriormente en la parte de formación

de biopelículas en los diferentes grupos y subgrupos de la fase de irrigación.

13.8 Análisis estadístico de resultados

Los datos paramétricos se analizaron utilizando el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) considerando los valores $P < 0,05$ estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó utilizando el software PrismAcademy (2025 GraphPad Software). Posterior se realizó pruebas post-hoc de Tukey.

14.Resultados

14.1 Fase 1: Desarrollo de biopelículas

14.1.1 Microscopía láser de barrido confocal (CLSM)

La observación mediante la microscopía láser de barrido confocal muestra en la **figura 15** una imagen representativa de CLSM en grupo control negativo donde se puede apreciar la propiedad de fluorescencia del diente sin presencia de microorganismos ni tinción.

Consiguiente en las **figuras 16 y 17** las imágenes de CLSM con el colorante BacLight TM LIVE / DEAD® a un aumento de 40x con los microorganismos *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* y la

biopelícula conformada por ambos microorganismos inter-reino dentro del conducto radicular.

La **figura 16** representa las biopelículas con 7 días de formación la fluorescencia en las biopelículas de los microorganismos de forma independiente es mayor que la biopelícula inter-reino, comienza una penetración de la biopelícula en los túbulos dentinarios que es proyectada en las imágenes 16c, 16f y 16i. Aunado a esta proyección la fluorescencia verde predomina en los tres grupos.

Posteriormente en la **figura 17** se presentan las biopelículas con 21 días de formación donde la fluorescencia es significativamente mayor y abarca mayor área del conducto radicular, en la figura 17i la biopelícula presenta una estructura sólida en comparación con el día 7 de formación.

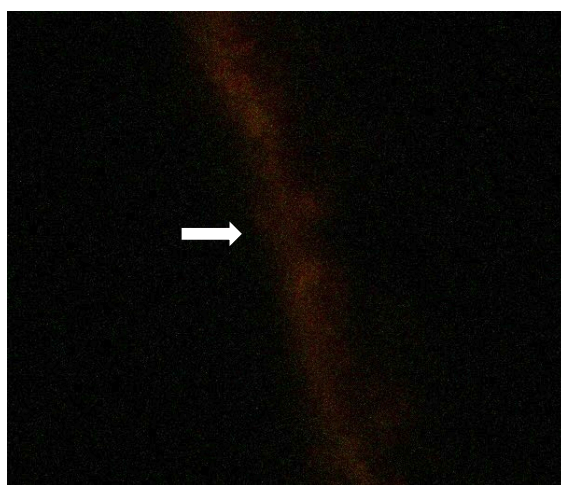


Figura 15. Grupo control negativo

Día 7

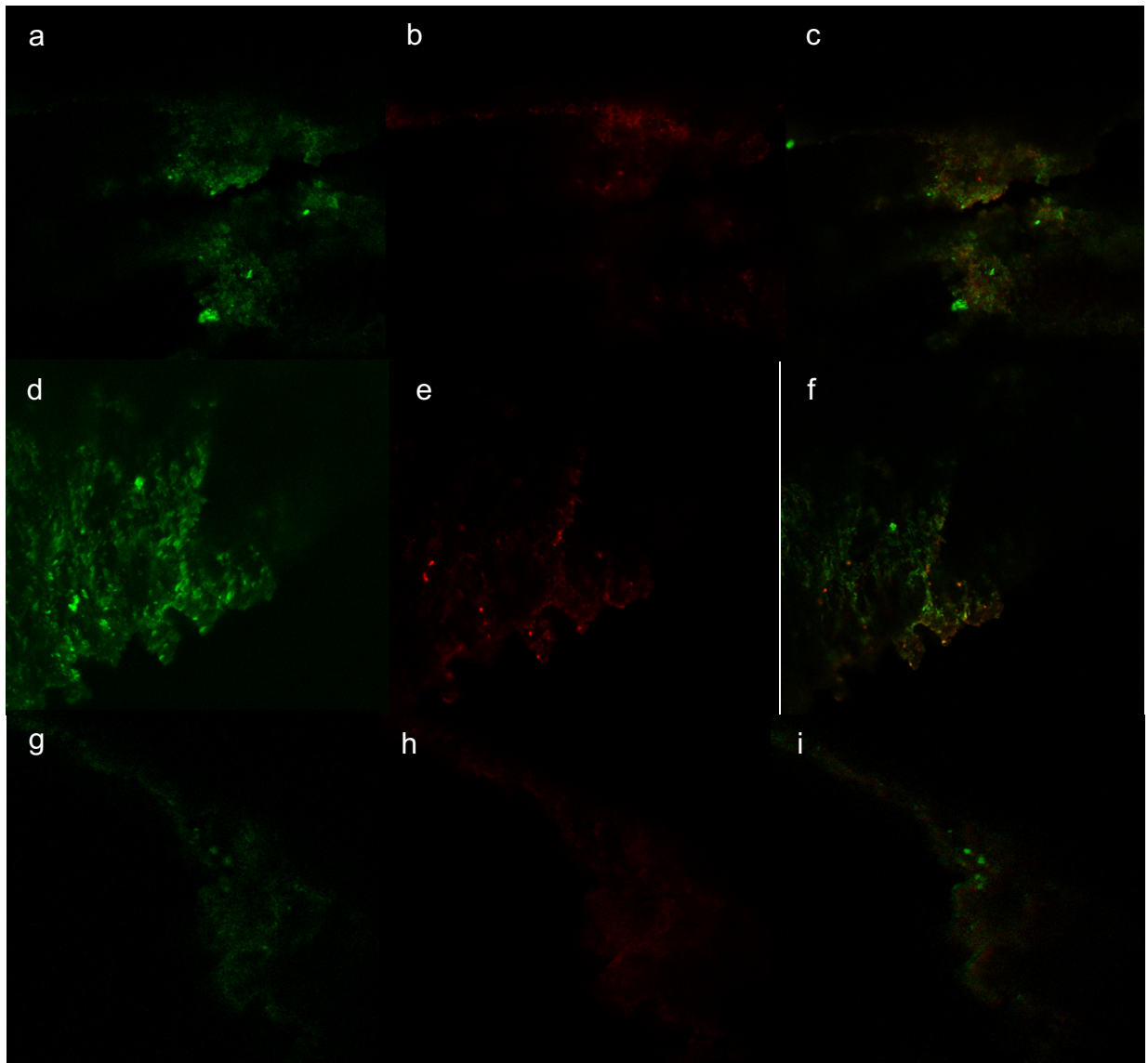


Figura 16. Imágenes de las biopelículas de *Enterococcus faecalis* (a,b y c), *Candida albicans* (d,e y f) y la combinación de ambos (g,h e i) a un aumento de 40x en la porción media/apical de la raíz obtenidas 7 días posteriores a la inoculación.

Día 21

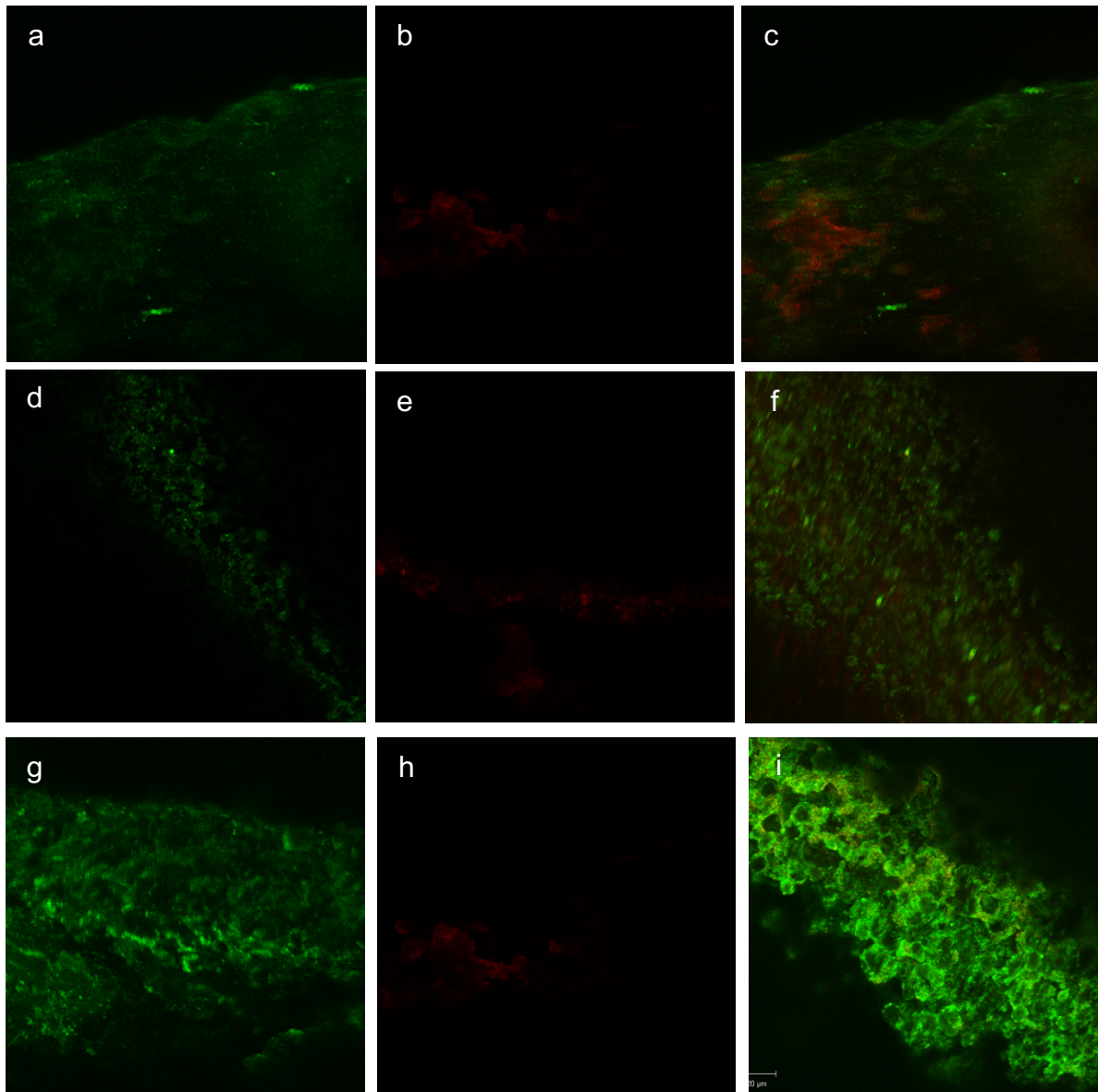


Figura 17. Imágenes de las biopelículas de *Enterococcus faecalis*(a,b y c), *Candida albicans* (d,e y f) y la combinación de ambos (g,h e i) a un aumento de 40x en la porción media/apical de la raíz obtenidas 21 días posteriores a la inoculación.

14.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Mediante microscopia electrónica de barrido se observó la formación de biopelículas de cada microorganismo e inter-reino en los conductos radiculares y un control negativo.

La **figura 18** y **figura 19** muestran las microfotografías a aumentos de 2500x, 5000x y 10,000x del tercio apical del conducto radicular posterior a 7 y 21 días de la formación de las biopelículas.

Las microfotografías obtenidas mostraron que las biopelículas se adhirieron a las paredes del conducto, así como su penetración en los túbulos dentinarios. *Enterococcus faecalis* se presentó en forma esférica, *Candida albicans* por su parte en su mayoría en forma de levadura o esférica con dimensiones mayores a *Enterococcus faecalis*. En las biopelículas inter-reino se observaron relación entre la bacteria y el hongo estrechamente enlazados al generar *Candida Albicans* una red de ancla para que los cocos de *Enterococcus faecalis* y facilitando así su adherencia al hongo.

En la **figura 18** en el control negativo (a y b) se observan los túbulos dentarios permeables, en las microfotografías continuas a 7 días de formación esta invasión moderada de los microorganismos. Mientras que en la **figura 19** las microfotografías muestran una saturación significativa donde incluso la morfología no es tan apreciable debido a esta unión y conformación de las biopelículas.

Día 7

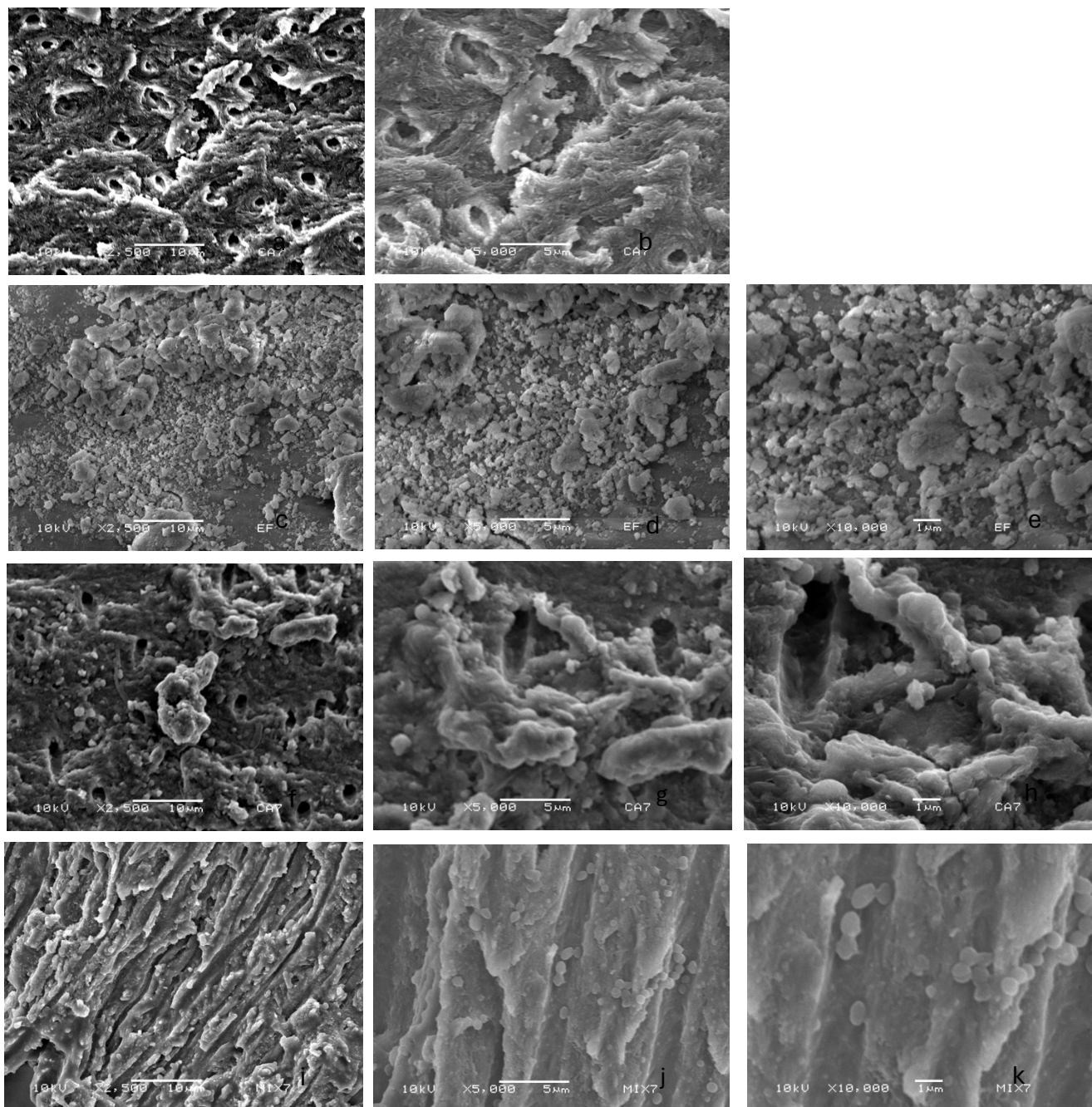


Figura 18. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los conductos radiculares de control negativo e infectados por *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* y ambos 7 días posteriores a inoculación a aumentos de 2500x (a,c,f,i), 5000x (b,d,g,j) y 10000x (e,h,k).

Día 21

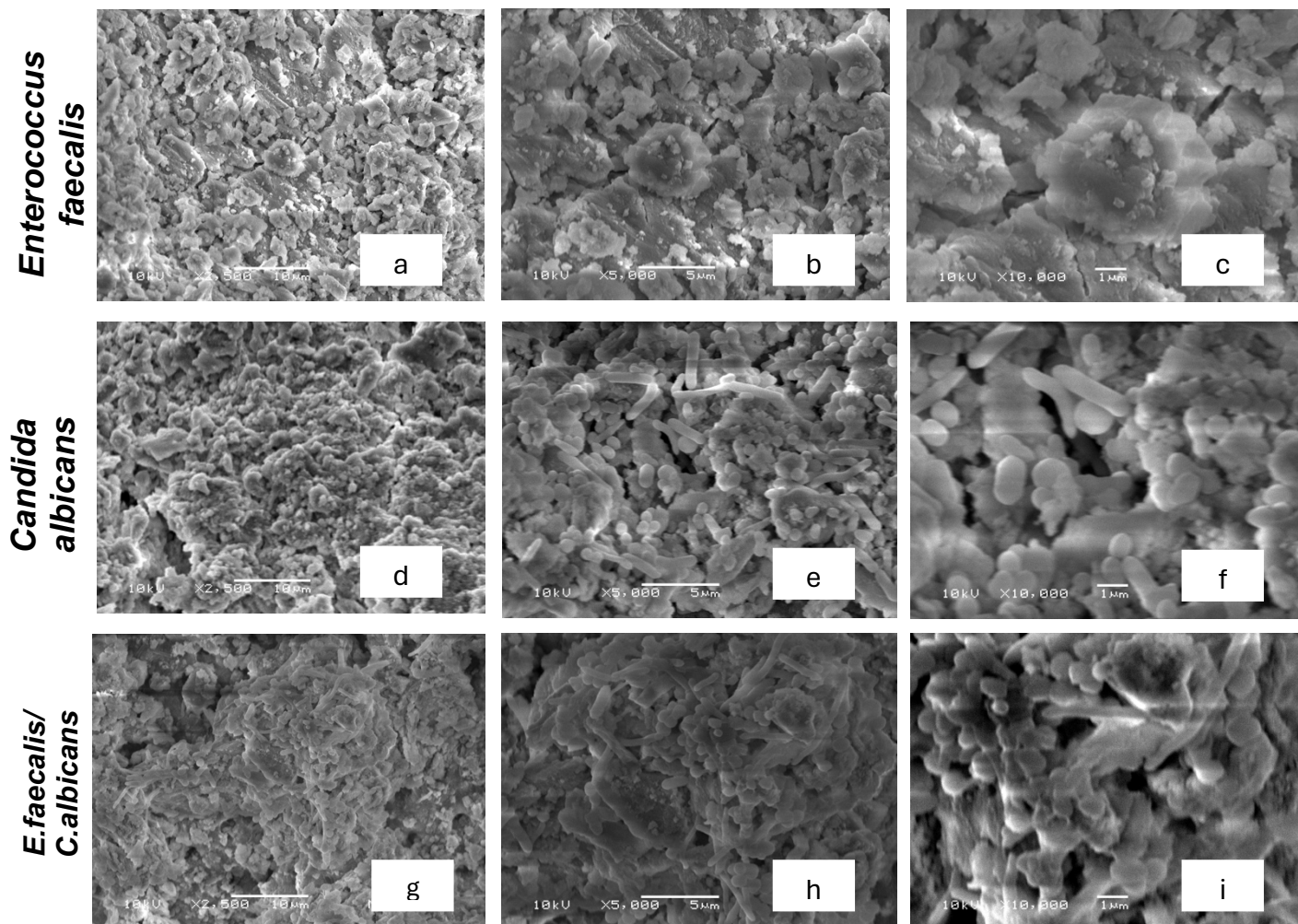
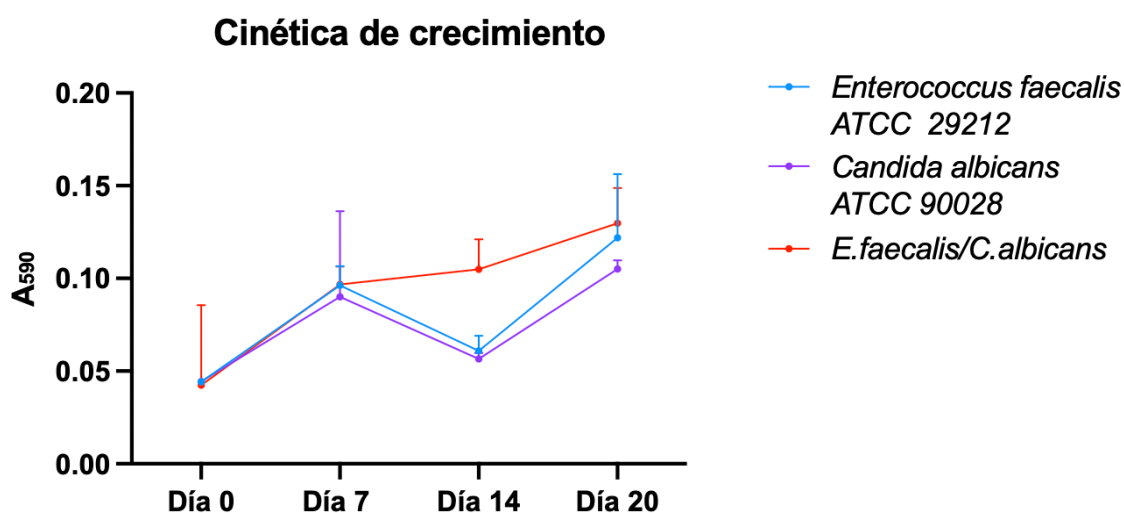


Figura 19. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los conductos radiculares infectados por *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* y ambos 21 días posteriores a inoculación a aumentos de 2500x (a,d,g), 5000x (b,e,f) y 10000x (c,f,i).

14.1.3 Cinética de crecimiento

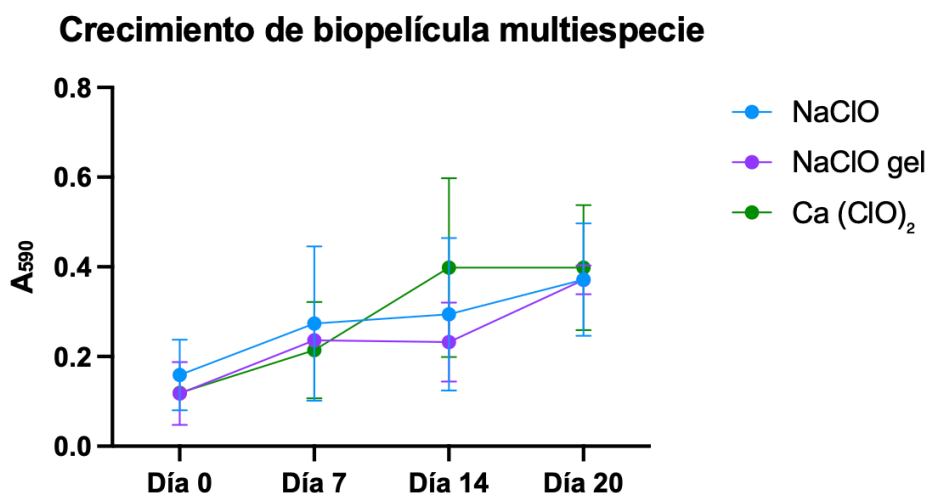
Los resultados de los recuentos de la absorbancia de las biopelículas de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e inter-reino se muestran en la **Gráfica 1**. Observando un crecimiento gradual y progresivo en función del tiempo de formación de la biopelícula al día 0, 7, 14 y 20 días de formación.

La cinética es similar en los grupos, sin embargo la biopelícula inter-reino muestra un crecimiento mayor. *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* de manera aislada siguen el mismo patrón de crecimiento.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento del día 0 al día 20 de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e inter-reino.

En la **gráfica 2** se presenta la cinética en relación con el crecimiento de biopelículas inter-reino a los días 0, 7, 14 y 20 previo a la fase 2 de irrigación, donde su crecimiento en los tres grupos mantiene estrecha relación y su resultado al día 20 en cuanto a absorbancia es ecuánime para así llevar a cabo la fase de irrigación con las mismas condiciones de biopelícula presente en los conductos radiculares.



Gráfica 2. Cinética de crecimiento de los grupos control de las biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* previo a irrigación.

14.2 Fase 2: Protocolo de irrigación

14.2.1 Microscopía láser de barrido confocal (CLSM)

Las imágenes obtenidas representativas de CLSM se observan en las **figuras 20 y 21** de las biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* posterior a la irrigación.

En la **figura 20** de los dientes irrigados con una concentración de 5.25% donde la fluorescencia no se presenta de esa manera tan significativa como en las imágenes de control previas obtenidas en la fase de formación de biopelículas en las **figuras 16 y 17**, sin embargo, la presencia de una fluorescencia mayormente de color rojo nos indica que la irrigación a esta concentración eliminó en su mayoría la biopelícula presente dentro del conducto radicular. El grupo de hipoclorito de sodio líquido e hipoclorito de calcio abarcan mayor superficie representando mayor penetración del irrigante en los túbulos dentinarios.

En la **figura 21** los dientes irrigados a una concentración de 2.5% con una mayor fluorescencia destacando los dos colores propios de la técnica, ya que en zonas intermedias se puede apreciar fluorescencia de color verde dando a representar que, si bien se eliminó parte de la biopelícula, pero quedan algunos microorganismos vivos.

Irrigación 5.25%

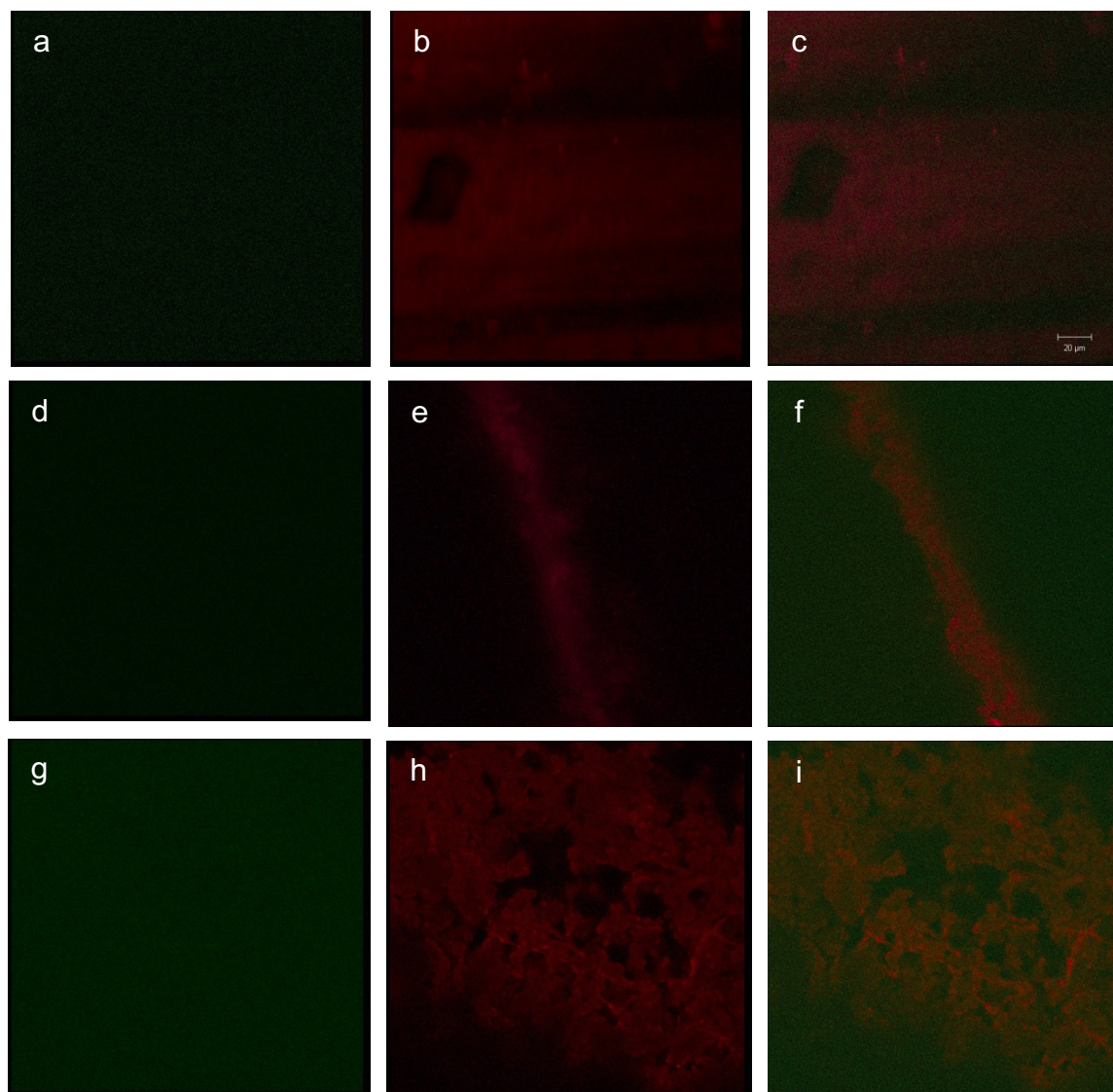


Figura 20. Imágenes CLSM de las biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* 21 días posterior a irrigación a una concentración de 5.25% con hipoclorito de sodio líquido (a, b y c), hipoclorito de sodio en gel (d,e y f) e hipoclorito de calcio (g,h e i).

Irrigación 2.5%

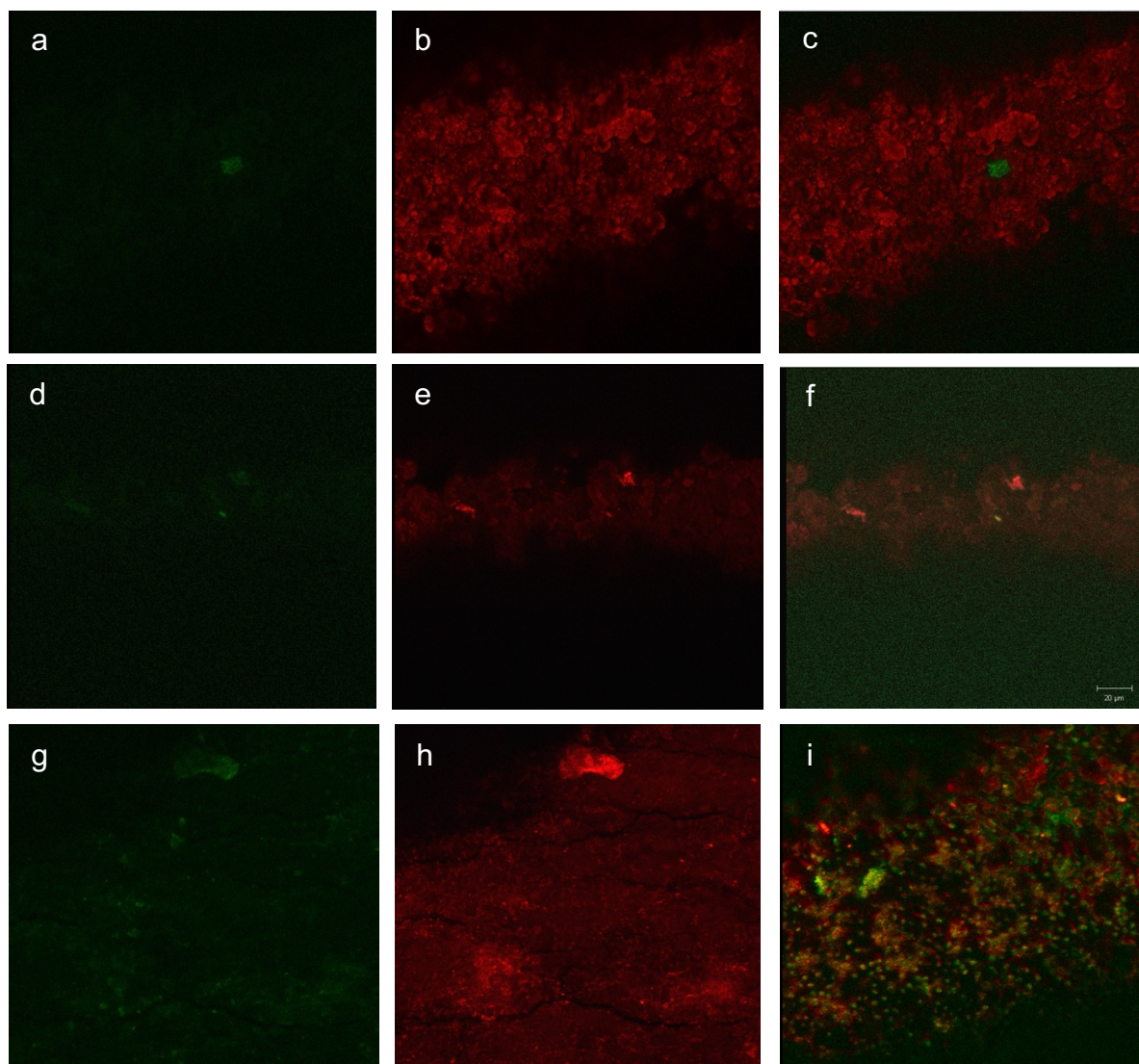


Figura 21. Imágenes CLSM de las biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* 21 días posterior a irrigación a una concentración de 2.5% con hipoclorito de sodio líquido (a,b y c), hipoclorito de sodio en gel (d,e y f) e hipoclorito de calcio (g,h e i).

14.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las microfotografías representativas de SEM posterior al tratamiento de irrigación son presentadas en las **figuras 22 y 23**. Se observan a cuatro aumentos: 50x, 2500x, 5000x y 10000x a nivel apical de la raíz observada.

En las microfotografías de la **figura 22** se observan las biopelículas irrigadas a una concentración de 5.25%, los irrigantes en consistencia líquida lograron irrumpir la biopelícula frente a el irrigante en gel donde se pueden apreciar acúmulos presentes posterior a la irrigación. Se puede observar frotis presente en los tres grupos.

A su vez en la **figura 23** a una concentración de irrigación de 2.5% los irrigantes empleados disminuyeron la biopelícula, pero se logra observar en el grupo de hipoclorito de sodio presencia de *Candida albicans*, en el hipoclorito de sodio en gel una biopelícula gruesa presente aún dentro del conducto radicular y por último, en el hipoclorito de calcio una mayor desinfección similar a los resultados obtenidos a la concentración de 5.25%.

Irrigación 5.25%

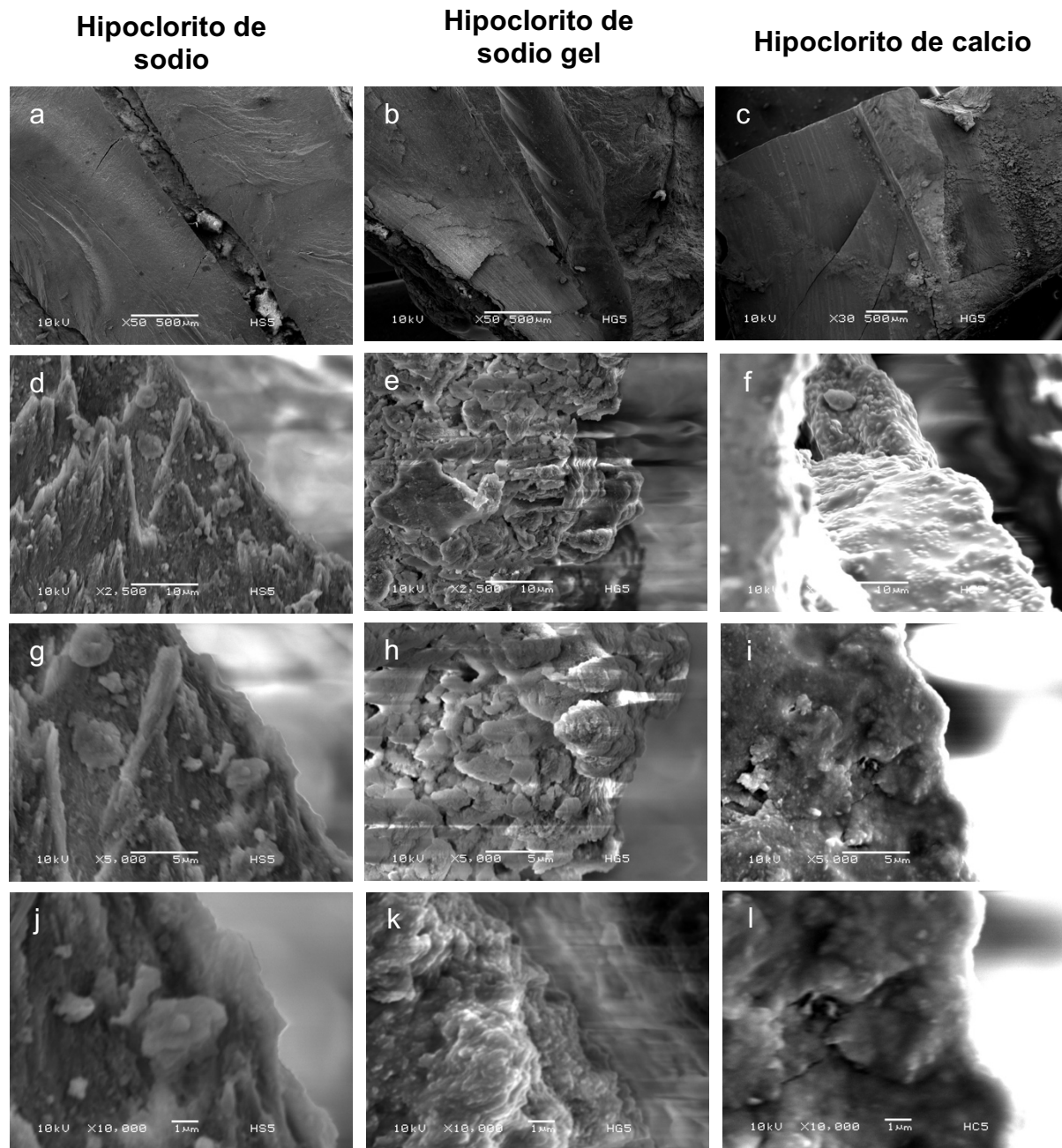


Figura 22. Microfotografías de SEM de las biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* de 21 días posterior a irrigación a una concentración de 5.25% a 50x, 2500x, 5000x y 10000x con hipoclorito de sodio líquido (a,d,g y j), hipoclorito de sodio en gel (b,e,h y k) e hipoclorito de calcio (c,f, i y l).

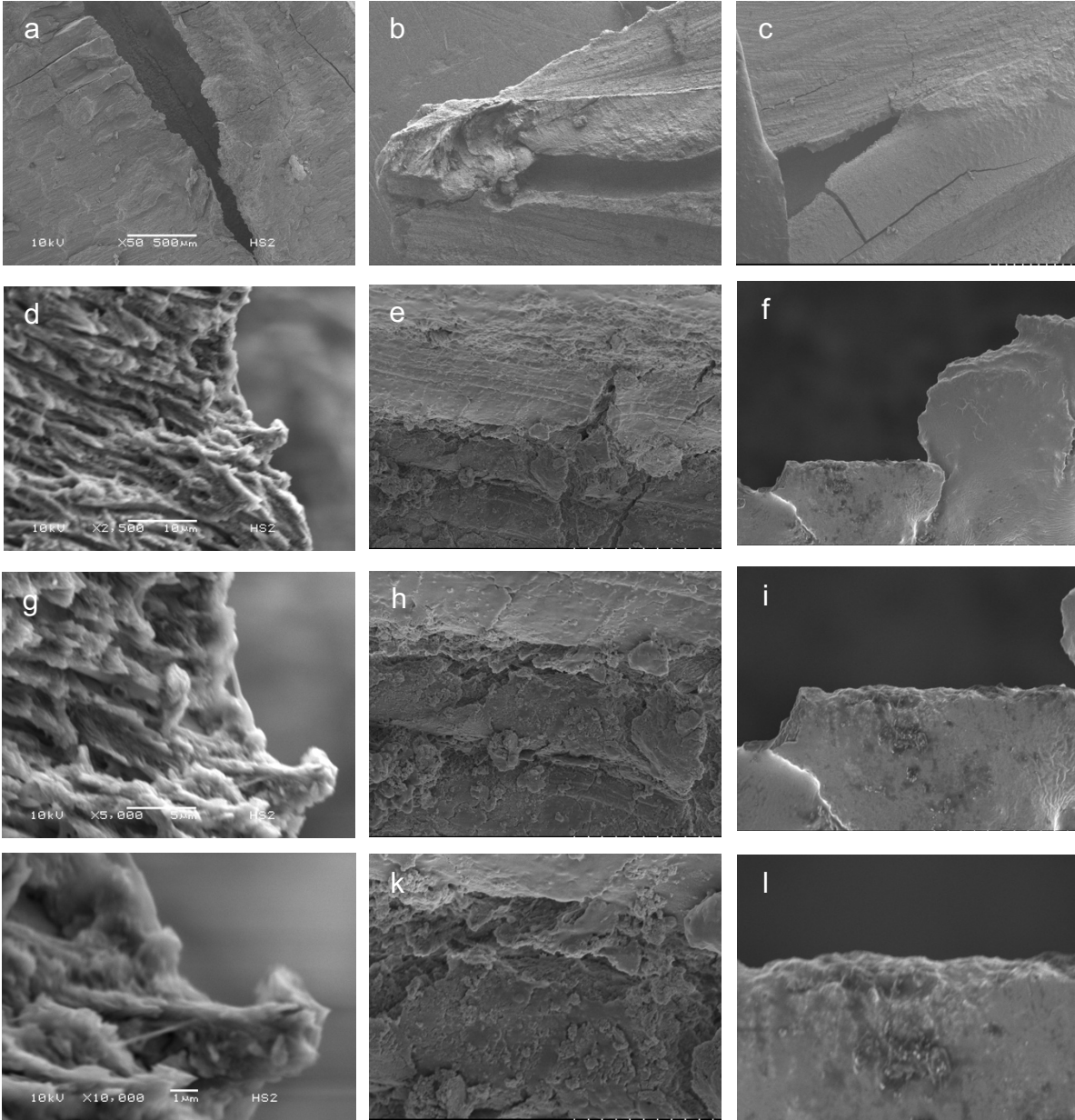


Figura 23. Microfotografías de SEM de las biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* de 21 días posterior a irrigación a una concentración de 2.5% a 50x, 2500x, 5000x y 1000x con hipoclorito de sodio líquido (a,d,g y j), hipoclorito de sodio en gel (b,e,h y k) e hipoclorito de calcio (c,f, i y l).

14.2.3 Ensayo XTT

Los resultados del ensayo XTT se representan en las tablas y gráficas de barras como una reducción general de la viabilidad de la carga bacteriana (%) en las **gráfica 3 y 4**.

Los análisis ANOVA en ambas concentraciones mostró un valor $P < 0.0001$ dando como resultado una diferencia estadísticamente significativa.

Los resultados de la prueba Tukey evaluaron seis muestras en cada grupo, en las **tablas 5 y 8** se puede apreciar que existe una diferencia estadísticamente significativa en el grupo control frente a los tres grupos de irrigación, a su vez que no existe diferencia entre los grupos de irrigación en cuanto a viabilidad.

La **gráfica 3** representa los resultados posteriores a una concentración de 5.25% de irrigación, muestra una viabilidad cuatro veces menor cuando existe una irrigación independientemente el irrigante empleado frente al grupo control.

Por su parte en la **gráfica 4** los resultados una concentración de 2.5% donde se puede observar que la viabilidad disminuyó la mitad de la viabilidad de la biopelícula en los tres grupos de irrigación frente al grupo control.

Tabla 3. Resultados ANOVA ensayo XTT irrigación al 5.25%

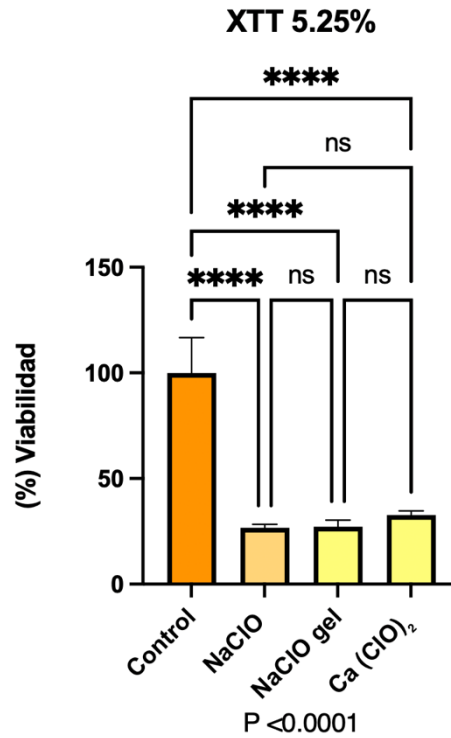
Resumen ANOVA	
F	102.7
Valor P	<0.0001
Resumen del valor P	****
¿Diferencia significativa entre medias ($P < 0,05$)?	Si
R al cuadrado	0.9391

Tabla 4. Tabla prueba Tukey irrigación al 5.25%

Número de familias	1
Número de comparaciones por familia	6
Alfa	0.05

Tabla 5. Prueba Tukey de ensayo XTT de irrigación al 5.25%

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Dif. media	95.00% CI de dif.	¿Por debajo del umbral?	Resumen	Valor P ajustado	
Control vs. NaClO	73.35	59.41 to 87.28	Si	****	<0.0001	A-B
Control vs. NaClO gel	72.81	58.88 to 86.75	Si	****	<0.0001	A-C
Control vs. CaClO	67.32	53.39 to 81.26	Si	****	<0.0001	A-D
NaClO vs. NaClO gel	-0.535	- 14.47 to 13.40	No	ns	0.9995	B-C
NaClO vs. CaClO	-6.023	- 19.96 to 7.912	No	ns	0.628	B-D
NaClO gel vs. CaClO	-5.488	- 19.42 to 8.447	No	ns	0.6922	C-D



Gráfica 3. Gráfico de barras de resultados de ensayo XTT de irrigación 5.25 %

Tabla 6. Resultados ANOVA de ensayo XTT al 2.5%

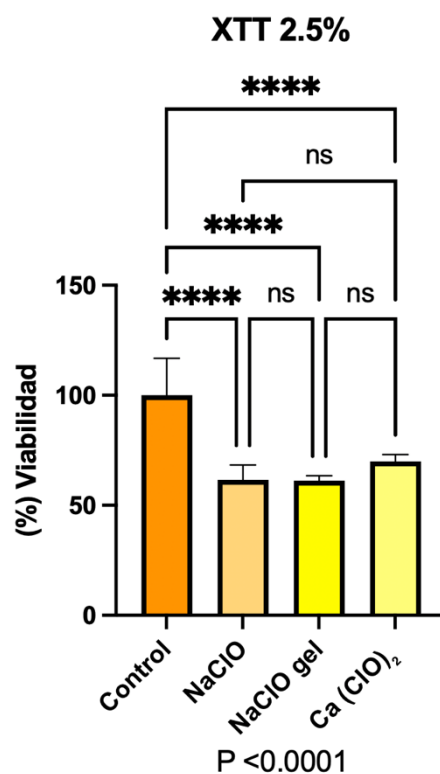
Resumen ANOVA	
F	23.62
Valor P	<0.0001
Resumen del valor P	****
¿Diferencia significativa entre medias (P < 0,05)?	Si
R al cuadrado	0.7799

Tabla 7. Tabla prueba Tukey irrigación al 2.5%

Número de familias	1
Número de comparaciones por familia	6
Alfa	0.05

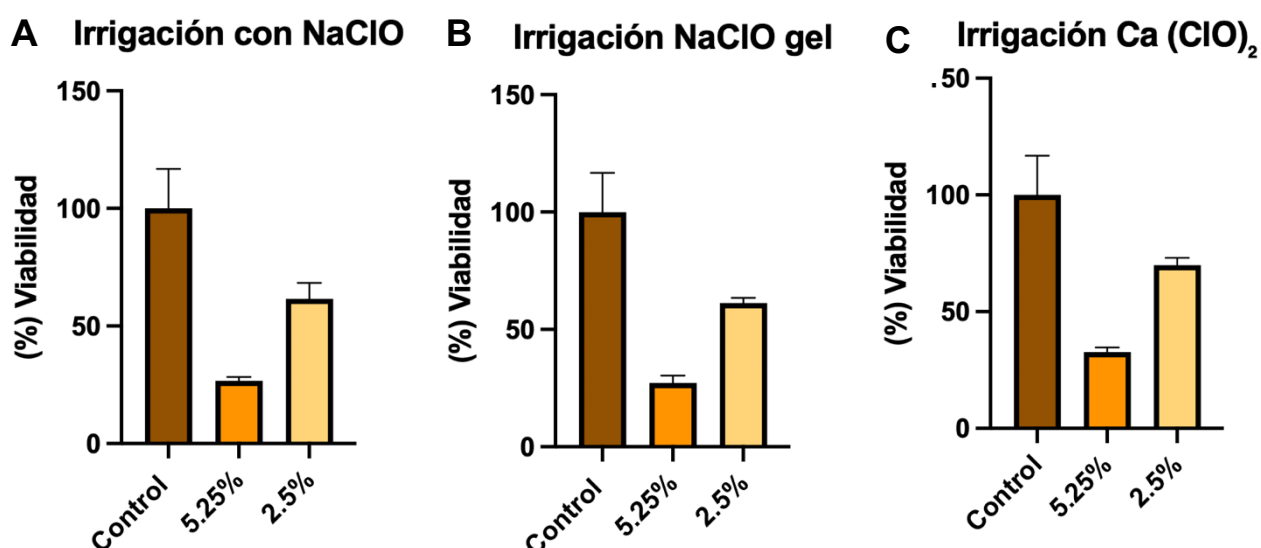
Tabla 8. Prueba de Tukey de ensayo XTT irrigación al 2.5%

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Dif. media	95.00% CI de dif.	¿Por debajo del umbral?	Resumen	Valor P ajustado	
Control vs. NaClO	38.48	23.55 to 53.41	Si	****	<0.0001	A-B
Control vs. NaClO gel	38.77	23.83 to 53.70	Si	****	<0.0001	A-C
Control vs. CaClO	30.05	15.12 to 44.98	Si	****	<0.0001	A-D
NaClO vs. NaClO gel	0.2867	- 14.64 to 15.22	No	ns	>0.9999	B-C
NaClO vs. CaClO	-8.425	- 23.36 to 6.505	No	ns	0.4121	B-D
NaClO gel vs. CaClO	-8.712	- 23.64 to 6.219	No	ns	0.3836	C-D

**Gráfica 4.** Gráfico de barras de resultados de ensayo XTT de irrigación 2.5 %

Comparación intragrupo

En la **gráfica 5** en sus apartados a, b y c muestran los resultados de viabilidad en porcentaje del grupo control frente a las concentraciones empleadas, generalmente se demuestra que existe una menor viabilidad celular a una concentración mayor del irrigante empleado independientemente de su consistencia e irrigante empleado.



Gráfica 5. Gráficas de barras de resultados de ensayo XTT con relación al irrigante y su concentración empleada contra grupo control.

14.2.4 Cristal Violeta

Los resultados de la tinción con cristal violeta para cuantificar la biomasa presente en el conducto radicular del grupo control y los grupos irrigados a dos concentraciones se cuantifico mediante absorbancia a 590nm.

Los resultados cualitativos del ensayo con cristal violeta se presentan en la **figura 24**, la biopelícula presente posterior a la irrigación dentro del conducto al ser desprendida y colocada en cajas de 24 pozos y siendo teñida, además de los grupos control positivo y negativo.

Los análisis ANOVA en ambas concentraciones mostró un valor $P < 0.0001$ dando como resultado una diferencia estadísticamente significativa.

Los resultados de la prueba Tukey evaluaron seis muestras en cada grupo, en las **tablas 11 y 14** se puede apreciar que existe una diferencia estadísticamente significativa en relación con la biomasa en el grupo control frente a los tres grupos de irrigación.

Se representa en la **gráfica 6** los resultados de biomasa a una concentración de irrigación de 5.25%, si bien existe diferencia del grupo control frente a los tres grupos, pero menor en el grupo de hipoclorito de gel. Más sin embargo no existió diferencia en comparación de los tres grupos de irrigación.

Posteriormente, en la **gráfica 7** a una concentración de 2.5% igualmente se obtuvo una diferencia significativa del grupo control frente al hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio, más sin embargo no existió en el hipoclorito de sodio en gel. Entre los irrigantes se mostró diferencia significativa entre las consistencias del hipoclorito de sodio, mostrando mayor biomasa en su presentación en gel.

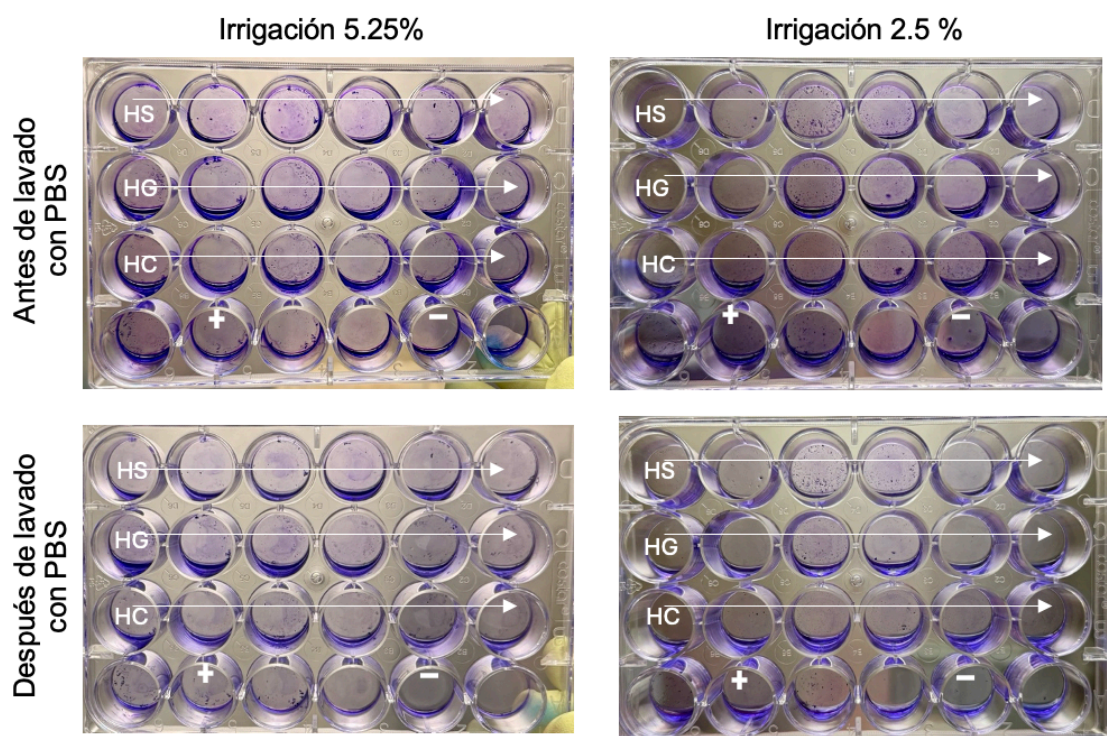


Figura 24. Cristal violeta post-irrigación al 5.25% y 2.5% al momento de aplicación y posterior al lavado del hipoclorito de sodio (HS), hipoclorito de sodio en gel (HG) e hipoclorito de calcio (HC).

Tabla 9. Resultados ANOVA cristal violeta irrigación al 5.25%

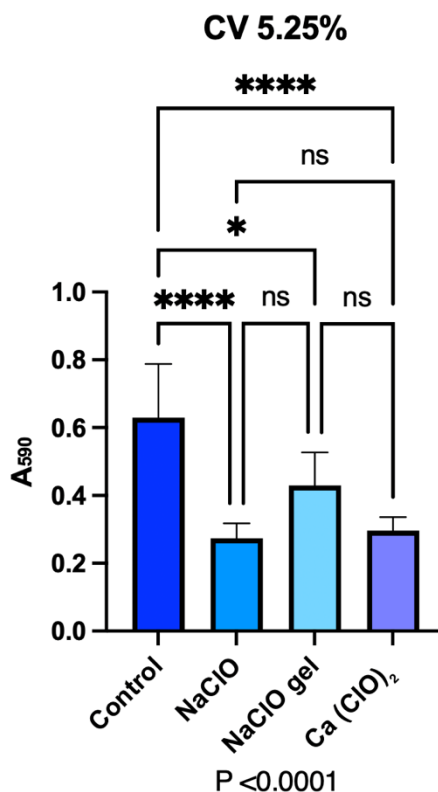
Resumen ANOVA	
F	16.76
Valor P	<0.0001
Resumen del valor P	****
¿Diferencia significativa entre medias ($P < 0,05$)?	Si
R al cuadrado	0.7155

Tabla 10. Tabla prueba Tukey irrigación al 5.25%

Número de familias	1
Número de comparaciones por familia	6
Alfa	0.05

Tabla 11. Prueba de Tukey cristal violeta de irrigación al 5.25%

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Dif. media	95.00% CI de dif.	¿Por debajo del umbral?	Resumen	Valor P ajustado	
Control vs. NaClO	0.3553	0.1975 to 0.5131	Si	****	<0.0001	A-B
Control vs. NaClO gel	0.1995	0.04170 to 0.3573	Si	*	0.0102	A-C
Control vs. CaClO	0.3333	0.1755 to 0.4911	Si	****	<0.0001	A-D
NaClO vs. NaClO gel	-0.1558	-0.3136 to 0.002021	No	ns	0.0538	B-C
NaClO vs. CaClO	-0.02202	-0.1798 to 0.1358	No	ns	0.9792	B-D
NaClO gel vs. CaClO	0.1338	-0.02404 to 0.2916	No	ns	0.1151	C-D



Gráfica 6. Gráfico de barras de resultados de cristal violeta de irrigación 5.25%

Tabla 12. Resultados ANOVA cristal violeta irrigación al 2.5%

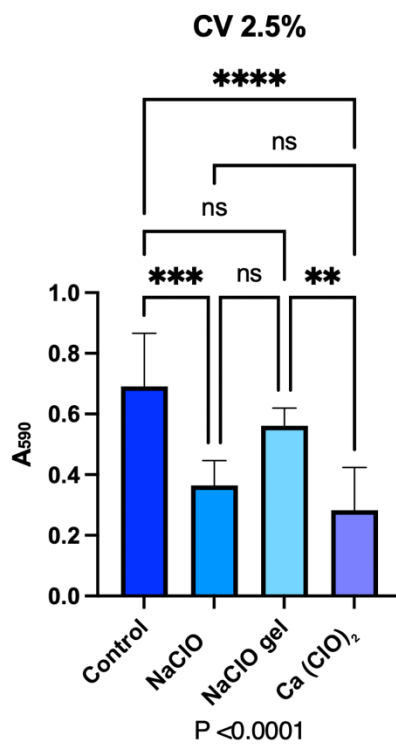
Resumen ANOVA	
F	13.76
Valor P	<0.0001
Resumen del valor P	****
¿Diferencia significativa entre medias (P < 0,05)?	Si
R al cuadrado	0.6737

Tabla 13. Tabla prueba Tukey irrigación al 2.5%

Número de familias	1
Número de comparaciones por familia	6
Alfa	0.05

Tabla 14. Tabla prueba de Tukey cristal violeta irrigación al 2.5%

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Dif. media	95.00% CI de dif.	¿Por debajo del umbral?	Resumen	Valor P ajustado	
Control vs. NaClO	0.3268	0.1287 to 0.5248	Si	***	0.0009	A-B
Control vs. NaClO gel	0.13	-0.06804 to 0.3281	No	ns	0.2858	A-C
Control vs. CaClO	0.4086	0.2105 to 0.6066	Si	****	<0.0001	A-D
NaClO vs. NaClO gel	-0.1967	-0.3948 to 0.001339	No	ns	0.052	B-C
NaClO vs. CaClO	0.08178	-0.1163 to 0.2799	No	ns	0.6605	B-D
NaClO gel vs. CaClO	0.2785	0.08044 to 0.4766	Si	**	0.0042	C-D



Gráfica 7. Gráfico de barras de resultados de cristal violeta de irrigación al 2.5%

15. Discusión

Las biopelículas intraconducto que no se logran erradicar logran una infección persistente que es una de las causas del fracaso del tratamiento de conductos, los estudios *IN-VITRO* han buscado igualar las condiciones para replicar estas biopelículas, una de estas características son el medio en el que crecerán estas biopelículas en el presente estudio se optó por trabajar con BHI debido a que Nicole de Mello Fiallos et al., 2022 lograron percibir una mayor formación de biomasa en el medio de cultivo BHI como se observó en las gráficas del presente estudio de cristal violeta en los grupos control.

Otro factor importante a considerar son los días de incubación de ambos microorganismos en relación a su cinética de crecimiento en una revisión de Uros Josic et al., 2022 donde al evaluar el valor de días que mejores resultados reportan son aquellos de 21 días de formación, en este estudio en la primera fase se crecieron las biopelículas a 7 y 21 días y fueron observadas para ver una biopelícula al día 21 con una mejor estructura donde se observaba mediante microfotografías SEM la densidad e incluso la relación de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

A través de las microfotografías de SEM y las imágenes de CLSM de la combinación de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* se logra corroborar lo mencionado por Sirui Yang et al., 2025 en un estudio reciente donde investigan esta estrecha relación debido a una comunicación intermicrobiana, esto a través de las vesículas extracelulares de *Candida albicans* que aportan mayor patogenicidad y resistencia a medicamentos, esta interacción se lleva a cabo sobre todo

con bacterias gram positivas como en este caso que se relacionó con la bacteria gram positiva *Enterococcus faecalis*.

Candida albicans sigue siendo reportado como el hongo con mayor prevalencia en el conducto radicular, presente en un 20% en dientes necróticos y un 11% en casos de reinfección. A su vez mayormente presente en infecciones post-tratamiento que en infecciones primarias reportado por Abraham, S.B., et al 2020, por su parte *Enterococcus faecalis* es la bacteria más estudiada en el campo de la endodoncia, su énfasis debido a que tiene la capacidad de recuperarse fácilmente y crecer en tratamientos realizados previamente y lesiones persistentes, por su parte al penetrar nuevamente el conducto radicular a través de fugas coronales y adherirse a la dentina con facilidad a pesar de que exista una obturación como lo menciona Mehmet Burak Guneser., et al 2016. Debido a lo reportado anteriormente el presente proyector se enfocó en estos dos microorganismos que se encuentran presentes en reinfecciones debido a su capacidad de incidir de nuevo en el conducto radicular, y que pese agentes químicos no se logran eliminar en su totalidad, y que a su vez al fusionarse en una sola biopelícula generan mayor capacidad de adaptación y de resistencia.

Pese a una instrumentación e irrigación los microorganismos que se alojan no logran en su totalidad ser eliminados, la búsqueda del irrigante con las propiedad antimicrobianas deseables y con baja citotoxicidad sigue siendo un factor de búsqueda, por eso numerosos investigadores continúan evaluando no solo el irrigante sino la concentración, tiempo y cantidad que se debe emplean para mejorar el tratamiento de conductos, el hipoclorito de sodio sigue dando mejores resultados más sin embargo en los últimos años se ha implementado su comparación

con el hipoclorito de calcio, Ozgur Ozturk et al., 2024 en su investigación demostraron la gran similitud en cuanto a los resultados de ambos y su capacidad de disolver tejido orgánico, esto corroborado con los resultados presentados de los ensayos de XTT y Cristal violeta donde se observa que ambos irrigantes mencionados mostraron resultados muy similares y estadísticamente sin diferencias. Esto debido a que, si bien una consistencia líquida tiene mayor fluidez, al ser una solución las partículas tienen un tamaño $<1\text{nm}$ y una consistencia en gel donde el tamaño de sus partículas no es continuo y puede variar de 1 a 100nm (Arvensisagro., 2019). Es por esto por lo que el hipoclorito de sodio líquido tiene la capacidad de fluir con facilidad dentro del conducto y penetrar en los túbulos dentinarios, mientras que el hipoclorito de sodio en gel por su viscosidad es menos probable que pueda abarcar mayor área de penetración.

La presentación del irrigante en comparativa de líquido y gel en relación al hipoclorito de sodio mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a biomasa mayormente, pero estos resultados relacionados con la viabilidad no mostraron diferencia.

La irrigación dentro del conducto radicular tuvo diferencia significativa frente al grupo control en todos los grupos de irrigantes. La concentración a la que es empleada el irrigante demostró tener importancia en cuanto a su efecto antimicrobiano, se pudo observar que a mayor concentración la viabilidad de los microorganismos disminuye correlacionado con las imágenes de CLSM donde la fluorescencia en la figura 17 es menor que en la imagen 18, se observa mayor concentración de color rojo llegando inclusive a abarcar mayor área dentro de los túbulos dentinarios, se encontró relación con los

mencionado en la investigación de Alexiea Lulue Benjamin Li BDS et al., 2022 donde refiere que evidentemente existe una relación entre no irrigar y la irrigación independientemente de la concentración, sin embargo encontró una diferencia entre una concentración por debajo de 2.5% y una mayor concentración a dicho porcentaje.

16. Conclusión

La creación de las biopelículas dentro del conducto radicular a partir de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* dentro de dientes extraídos fue viable al determinar los parámetros como el uso del medio adecuado y los días de crecimiento para una biopelícula madura y óptima para exponerse a los dos irrigantes como lo fueron hipoclorito de sodio en consistencia líquida y gel e hipoclorito de calcio para así determinar la eficacia para lograr un efecto antimicrobiano y así obtener una comparación a diferentes concentraciones. Mediante ensayos como XTT y cristal violeta, e imágenes obtenidas de microscopio confocal y SEM se analizó la resistencia de ambos microorganismos dentro del conducto radicular previo y posterior a la irrigación, mediante dicho análisis se determinó que a la concentración de 5.25% el irrigante logra eliminar mayor biopelícula dentro del conducto radicular como en nuestra hipótesis.

Por su parte basado en los resultados, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ podría ser una alternativa prometedora de irrigación del conducto radicular.

17. Bibliografía

1. Ali A, Bhosale A, Pawar S, et al. (May 08, 2022) Current Trends in Root Canal Irrigation. *Cureus* 14(5): e24833. doi:10.7759/cureus.24833
2. Da Silva Goulart, R., Oliveira-Silva, M., Júnior, M. F., Silva-Sousa, Y. T. C., Miranda, C. E. S., & Pitondo-Silva, A. (2024). Optimized protocol for collecting root canal biofilms for in vitro studies. *Journal Of Microbiological Methods*, 107048. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.107048>
3. Ahmed, S., Hassan, S. J., Gajdhar, S., Alhazmi, L. S., Khalifah, R. Y., Alrifai, J. A., Aljhdali, S. S., & Maqbul, M. S. (2024). Prevalence of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in endodontic retreatment Cases: A comprehensive study. *The Saudi Dental Journal*, 36(4), 539-545. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2024.01.009>
4. Drews, D. J., Nguyen, A. D., Diederich, A., & Gernhardt, C. R. (2023). The Interaction of Two Widely Used Endodontic Irrigants, Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite, and Its Impact on the Disinfection Protocol during Root Canal Treatment. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(3), 589. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030589>
5. Li, Y., Wang, Y., Chen, X., Jiang, W., Jiang, X., Zeng, Y., Li, X., Feng, Z., Luo, J., & Zhang, L. (2020). Antimicrobial peptide GH12 as root canal irrigant inhibits biofilm and virulence of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, 53(7), 948-961. <https://doi.org/10.1111/iej.13296>
6. Costerton, J.W. (2007) *The biofilm primer*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
7. Siqueira, J. F., Jr, & Rôças, I. N. (2022). Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *International endodontic journal*, 55 Suppl 3, 512–530. <https://doi.org/10.1111/iej.13677>.
8. Ye, W., Yeghiasarian, L., Cutler, C. W., Bergeron, B. E., Sidow, S., Xu, H. H., Niu, L., Ma, J., & Tay, F. R. (2019). Comparison of the use of d-enantiomeric and l-enantiomeric antimicrobial peptides incorporated in a calcium-chelating irrigant against *Enterococcus faecalis* root canal wall biofilms. *Journal Of Dentistry*, 91, 103231. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.103231>.
9. Estornell, J. (2023, 23 agosto). *Componentes y funciones de la matriz de los biofilms bacterianos*. Christeyns. <https://www.christeyns.com/es-es/componentes-y-funciones-de-la-matriz-de-los-biofilms-bacterianos-2/>
10. Zaborskytė, G., Wistrand-Yuen, E., Hjort, K., Andersson, D. I., y Sandegren, L. (2022). Dispositivo modular de biofilm de clavijas impresa en 3D para la configuración flexible de estudios de biofilmes relacionados con la superficie. *Fronteras en microbiología celular e infecciosa*, 11, 802303. <https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fcimb.2021.802303>.

11. Tom Coenye, Hans J. Nelis, In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 83, Issue 2, 2010, Pages 89-105, ISSN 0167-7012, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.018>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701210002848>).
12. Han, A., Lee, SY. Una visión general de varios métodos para la formación de biofilm in vitro: una revisión. *Food Sci Biotechnol* 32, 1617–1629 (2023). <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s10068-023-01425-8>.
13. Pelczar, R. M. and Pelczar, Michael J. (2025, February 4). microbiology. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/microbiology>
14. Gerardi, D., Bernardi, S., Bruni, A., Falisi, G., & Botticelli, G. (2024). Characterization and morphological methods for oral biofilm visualization: where are we nowadays?. *AIMS microbiology*, 10(2), 391–414. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2024020>
15. Shreehari Kodakkat, Serena Ch'ng, Tahnim Sultana, Michelle M. Leong, Z.L. Shaw, David R. Nisbet, Paul A. Ramsland, Aaron Elbourne, Samuel Cheeseman, Chapter Two - Biofilm characterization: Imaging, analysis and considerations, *Methods in Microbiology*, Academic Press, Volume 54, 2024, Pages 39-79, ISSN 0580-9517, <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2024.01.001>.
16. Bhuyan, S., Yadav, M., Giri, S. J., Begum, S., Das, S., Phukan, A., Priyadarshani, P., Sarkar, S., Jayswal, A., Kabyashree, K., Kumar, A., Mandal, M., & Ray, S. K. (2023). Microliter spotting and micro-colony observation: A rapid and simple approach for counting bacterial colony forming units. *Journal of microbiological methods*, 207, 106707. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106707>
17. Shuvam Bhuyan, Mohit Yadav et al. Microliter spotting and micro-colony observation: A rapid and simple approach for counting bacterial colony forming units, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 207, 2023, 106707, ISSN 01677012, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106707>.
18. Alonso, B., Cruces, R., Pérez, A., Sánchez-Carrillo, C., & Guembe, M. (2017). Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 139, 135–137. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.004>.
19. Guneser, M. B., & Eldeniz, A. U. (2016). The effect of gelatinase production of *Enterococcus faecalis* on adhesion to dentin after irrigation with various endodontic irrigants. *Acta Biomaterialia Odontologica Scandinavica*, 2(1), 144-149. <https://doi.org/10.1080/23337931.2016.1256212>
20. Amador, C. I., Stannius, R. O., Røder, H. L., & Burmølle, M. (2021). High-throughput screening alternative to crystal violet biofilm assay combining

- fluorescence quantification and imaging. *Journal Of Microbiological Methods*, 190, 106343. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106343>.
21. Mancera, G. G., & Amaya, M. E. N. (2024). *Principios de microscopía electrónica de barrido y microanálisis por rayos X característicos*. UNAM, Facultad de Química.
 22. Elliott AD. Microscopía confocal: principios y prácticas modernas. *Curr Protoc Cytom.* 2020 Mar;92(1):e68. doi: 10.1002/cpcy.68. PMID: 31876974; PMCID: PMC6961134.
 23. Nawrocka, A., Piwonski, I., Sauro, S., Porcelli, A., Hardan, L. y Lukomska-Szymanska, M. (2021). Técnicas microscópicas tradicionales empleadas en la investigación de la adhesión dental: aplicaciones y protocolos de preparación de muestras. *Biosensors*, 11 (11), 408. <https://doi.org/10.3390/bios11110408> <https://www.electronmicroscopes.com>. <https://www.electron-microscopes.com/wp-content/uploads/2023/08/Thermo-Scientific-Scanning-Electron-Microscopy-working-principle.pdf>.
 24. Guarneros GarcíaOrlando, de Vicente y Oliva, Jesús, Ocaña Moreno, José Luis, Maya Méndez, Mauro Eduardo, Rodríguez Reyna, Sandra Luz, & Espericueta González, Dora Erika. (2012). Uso del microscopio confocal para la caracterización dimensional en micromecanizados (step height). *Ingeniería mecánica, tecnología y desarrollo*, 4(2), 73-80. Recuperado en 23 de abril de 2025, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-73812012000100005&lng=es&tlng=es.
 25. Egerton, R. (2011). *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer Science & Business Media.
 26. *Scanning Electron Microscopy | Principles of Scanning Electron Microscopy | Thermo Fisher Scientific - US*. (s. f.). <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/materials-science/learning-center/applications/scanning-electron-microscope-sem-electron-column.html>
 27. Xu, J., Gao, Y., Meng, Y., Wu, W., Tsauo, C., Guo, T., Cao, Y., Huang, D., Zhou, X., & He, J. (2020). Mechano-chemical coupling of irrigation enhances endodontic biofilm debridement. *Biofouling*, 36(7), 792–799. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1814753>.
 28. Keskin, C., Demiryürek, E. Ö., & Onuk, E. E. (2017). Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary/Persistent Endodontic Infections. *Journal of Endodontics*, 43(8), 1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.019>.
 29. Nardello, L. C. L., Pinheiro, E. T., Gavini, G., Prado, L. C., Romero, R. X., Gomes, B. P. F. A., & Skelton-Macedo, M. C. (2022). Nature and Prevalence of Bacterial Taxa Persisting after Root Canal Chemomechanical Preparation in Permanent Teeth: A Systematic Review and Meta-analysis. In *Journal of*

- Endodontics* (Vol. 48, Issue 5, pp. 572–596). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2022.01.016>.
30. Srihawan, O., Panichuttra, A., Lertchirakarn, V., & Matangkasombut, O. (2024). Efficacy of chitosan root canal medicament against cross-kingdom dual-species biofilm of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in an in vitro root-canal model. *Odontology*, 10.1007/s10266-024-01024-x. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s10266-024-01024-x>
 31. Du, Q., Yuan, S., Zhao, S., Fu, D., Chen, Y., Zhou, Y., Cao, Y., Gao, Y., Xu, X., Zhou, X., & He, J. (2021). Coexistence of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* increases biofilm virulence and periapical lesions in rats. *Biofouling*, 37(9-10), 964-974. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1993836>.
 32. Daca, A., & Jarzembowski, T. (2024). From the Friend to the Foe- *Enterococcus faecalis* Diverse Impact on the Human Immune System. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 25, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/ijms25042422>.
 33. Yavagal, C., Subramani, S. K., Patil, V. C., Yavagal, P. C., Talwar, R. P., Hebbal, M., Saadaldin, S. A., Eldwakhly, E., Abdelhafeez, M. M., & Soliman, M. (2023). Disinfection Efficacy of Laser Activation on Different Forms and Concentrations of Sodium Hypochlorite Root Canal Irrigant against *Enterococcus faecalis* in Primary Teeth. *Children*, 10(12), 1887. <https://doi.org/10.3390/children10121887>.
 34. Li, Y., Wang, Y., Chen, X., Jiang, W., Jiang, X., Zeng, Y., Li, X., Feng, Z., Luo, J., & Zhang, L. (2020). Antimicrobial peptide GH12 as root canal irrigant inhibits biofilm and virulence of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, 53(7), 948-961. <https://doi.org/10.1111/iej.13296>.
 35. Pauletto, G., Guerim, P. H. F., Barbosa, A. L. P., Lopes, L. Q. S., Bier, C. A. S., & Marquezan, P. K. (2024). Efficacy of calcium hypochlorite in disinfection of gutta-percha cones contaminated with *Candida albicans*. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 55(1), 403-410. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01255-8>.
 36. Ahmed, S., Hassan, S., Gajdhar, S., Alhazmi, L. S., Khalifah, R. Y., Alrifai, J. A., Aljhdali, S. S., & Maqbul, M. S. (2024). Prevalence of *Enterococcus Faecalis* and *Candida albicans* in Endodontic Retreatment Cases: A Comprehensive Study. *The Saudi Dental Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2024.01.009>.
 37. Abraham, S. B., Marzooq, F. A., Himratul-Aznita, W. H., Ahmed, H. M. A., & Samaranayake, L. P. (2020). Prevalence, virulence and antifungal activity of *C. albicans* isolated from infected root canals. *BMC Oral Health*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01347-5>.

38. Gomes, B. P. F. A., Aveiro, E., y Kishen, A. (2023). Irrigantes y sistemas de activación de riego en Endodoncia. *Revista dental brasileña*, 34(4), 1–33. <https://doi.org/10.1590/0103-6440202305577>
39. Berman, L. H., & Hargreaves, K. M. (2022). *Cohen. Vías de la Pulpa* (K. M. Hargreaves, Ed.; 12a ed.). Elsevier.
40. Ali A, Bhosale A, Pawar S, et al. (May 08, 2022) Current Trends in Root Canal Irrigation. *Cureus* 14(5): e24833. doi:10.7759/cureus.24833
41. Ali A, Bhosale A, Pawar S, et al. (May 08, 2022) Current Trends in Root Canal Irrigation. *Cureus* 14(5): e24833. doi:10.7759/cureus.24833.
42. Drews, D., Nguyen, A. D., Diederich, A., & Gernhardt, C. R. (2023). The Interaction of Two Widely Used Endodontic Irrigants, Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite, and Its Impact on the Disinfection Protocol during Root Canal Treatment. *Antibiotics*, 12(3), 589. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030589>.
43. Kotecha, N., Shah, N., Doshi, R. J., Kishan, K. V., Luke, A. M., Shetty, K. P., Mustafa, M., & Pawar, A. (2023). Microbiological Effectiveness of Sodium Hypochlorite Gel and Aqueous Solution When Implemented for Root Canal Disinfection in Multirrooted Teeth: A Randomized Clinical Study. *Journal Of Functional Biomaterials*, 14(5), 240. <https://doi.org/10.3390/jfb14050240>.
44. De Pellegrin, S. F., Pauletto, G., Carlotto, I. B., Mendes, A. L. G., Mello, P. A., & Bier, C. A. S. (2023). Interactions Between Calcium Hypochlorite and Irrigants Commonly Used in Endodontic Practice: A Chemical Analysis. *Journal Of Endodontics*, 49(7), 894-900. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2023.05.003>.
45. Ozturk, O., Genc Sen, O. Evaluation of pulp tissue dissolving efficiency of sodium and calcium hypochlorite solutions activated by ultrasonics and laser: an in vitro study. *BMC Oral Health* 24, 1046 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12903-024-04852-z>
46. Ahmed, S., Hassan, S., Gajdhar, S., Alhazmi, L. S., Khalifah, R. Y., Alrifai, J. A., Aljhdali, S. S., & Maqbul, M. S. (2024). Prevalence of Enterococcus Faecalis and Candida albicans in Endodontic Retreatment Cases: A Comprehensive Study. *The Saudi Dental Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2024.01.009>.
47. Arruda-Vasconcelos, R., Barbosa-Ribeiro, M., Louzada, L. M., Lemos, B. I. N., De Jesus Soares, A., Ferraz, C. C. R., De Almeida, J. F. A., Marciano, M. A., & De Almeida Gomes, B. P. F. (2022). Efficacy of 6% Sodium Hypochlorite on Infectious Content of Teeth with Symptomatic Irreversible Pulpitis. *Journal Of Endodontics*, 48(2), 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.11.002>.
48. Dumani, A., Tanrisever, D., Sihay, D., Kuzu, S., Yilmaz, Ş., & Guvenmez, H. (2019). Efficacy of calcium hypochlorite with and without Er,Cr: Yttrium, scandium, gallium, garnet laser activation on Enterococcus faecalis in

- experimentally infected root canals. *Nigerian Journal Of Clinical Practice*, 22(2), 215. https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_457_18.
49. Sonntag, D. (2010). Éxito empírico frente a evidencia. ¿De qué evidencias se dispone en la endodoncia? *Quintessence*, 23(3), 93-101. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3169402>
50. *Amoquimicos*. (s. f.-b). <https://www.amoquimicos.com/noticias/usos-y-precauciones-hipoclorito-de-calcio>
51. *Amoquimicos*. (s. f.-a). <https://www.amoquimicos.com/noticias/todo-sobre-el-hipoclorito-de-sodio>
52. *Salud celular: Viabilidad, proliferación, citotoxicidad y función celular*. (s. f.). <https://es.moleculardevices.com/applications/cell-viability-proliferation-cytotoxicity-assays>
53. *RAE*. (s. f.). Diccionario Real Academia Española. <https://dle.rae.es/concentración>
54. *RAE*. (s. f.). Diccionario Real Academia Española. <https://dle.rae.es/concentración>
55. Estornell, J. (2023, 23 agosto). *Componentes y funciones de la matriz de los biofilms bacterianos*. Christeyns. <https://www.christeyns.com/es-es/componentes-y-funciones-de-la-matriz-de-los-biofilms-bacterianos-2/>
56. *Biopelícula > Información, biografía, archivo, historia*. (s. f.). WIKIDAT. <https://es.wikidat.com/info/Biopel%C3%ADcula>
57. *Biomasa | IDAE*. (s. f.). <https://www.idae.es/tecnologias/energias-renovables/uso-termico/biomasa>
58. Li, A. L. B., Markvart, M., & Abbott, P. V. (2021). Effect of Different Concentrations of Sodium Hypochlorite on the Compressive Strength of Endodontically Treated Roots. *Journal Of Endodontics*, 48(3), 370-374. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.12.006>

