



\* Cursante de la Carrera de Especialización en Endodoncia  
7º Cohorte

| F.O.R. | U.N.R

Recibido : Noviembre 2007  
Aceptado: Marzo 2008

## INDICE

<b>I.</b> Introducción .....	<b>67</b>
<b>II.</b> Concepto .....	<b>68</b>
<b>III.</b> Por qué aprender sobre los Biofilms .....	<b>69</b>
<b>IV.</b> Fases de la formación .....	<b>70</b>
<b>V.</b> Estructura .....	<b>74</b>
<b>VI.</b> Relación entre Necrosis Pulpar y Biofilm .....	<b>77</b>
<b>VII.</b> Biofilm en las infecciones endodónticas .....	<b>78</b>
<b>VIII.</b> Susceptibilidad a la Terapéutica Endodóntica .....	<b>81</b>
<b>IX.</b> Anexo - Discusión .....	<b>84</b>
<b>X.</b> Conclusiones .....	<b>86</b>
<b>XI.</b> Glosario .....	<b>87</b>
<b>XII.</b> Referencias Bibliográficas .....	<b>88</b>

## **I | INTRODUCCIÓN**

Extraña naturaleza la de los microorganismos que llegan a sobrevivir en la Región Periapical. Su poderosa propiedad de ubicuidad hasta en sitios prácticamente invisibles, sus complejos mecanismos de organización, sinergismo y mutación, condiciones endodónticas selectivas, y la garantía de un aporte nutritivo circulatorio mucho más importante que el del tejido pulpar van a ser determinantes esenciales para la difusión y diseminación de los microorganismos que integran el biofilm.

Estan demostrados los esfuerzos que han hecho la Microbiología y la Ciencia Endodóntica para llegar a descifrar los secretos de esta singular estructura a pesar de que día tras día van surgiendo nuevos interrogantes.

Necesitamos que los tratamientos que empleemos para combatir al biofilm logren oxigenar el ecosistema periapical y fundamentalmente raspar y desprender las bacterias fuertemente adheridas.

Conociendo el proceso de formación del Biofilm, el metabolismo microbiano y las estrategias que ellos mismos utilizan para resistir y permanecer ocultos pero activos, sabremos por qué llegamos a observar lesiones periapicales refractarias. Nuestro desafío será volver a tener el control de la situación, cambiando potencial patogénico del Biofilm por una relación de anfibiosis benéfica para la salud.

## II | CONCEPTO DEL BIOFILM

Costerton (1987) citado por Serrano-Granger J. Y Herrera D. (2005) afirma que un biofilm es la forma de crecimiento más frecuente de las bacterias y se definió en un principio como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido (Serrano-Granger J. y Herrera D. 2005).

Donlan y Costerton (2002) citados por Gonçalves J. (2007) definen la biopelícula como una comunidad microbiana sésil e inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que están irreversiblemente adheridas a un sustrato, interfase o las unas a las otras, permaneciendo embebidas en una matriz de polisacáridos extracelulares que ellas mismas producen, exhibiendo un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción genética. Donlan continúa diciendo que cada comunidad microbiana en las biopelículas es única, aunque algunos atributos estructurales pueden ser generalmente considerados universales. Lo primero que se debe resaltar en este sentido es que la unidad básica estructural de la biopelícula es la microcolonia, la cual facilita la proximidad entre las células, favoreciendo un ambiente ideal para la creación de gradientes de nutrientes, intercambio de genes y quórum sensing (Gonçalves J. 2007).

Los biofilms se definen como “matriz de polisacáridos que incluye poblaciones bacterianas adheridas una a la otra /o a las superficies o interfases” (Distel J. W. y col. 2002).

Simplemente los biofilms son una colección de microorganismos rodeados por sus productos de secreción, conectado a una superficie inerte o viva. Los biofilms existen en cualquier parte donde las superficies se pongan en contacto con el agua. Más del 99% de todas las bacterias viven en comunidades como biofilms. Burleson Aaron y col et al sostienen que el biofilm ha sido descrito como una compleja agregación de bacterias asociadas con una superficie y embebidas en una matriz de polisacárido extracelular (Burleson A. y col. 2007; Dreeszen P. 2003; Duggan J. y col. 2007).

### III | POR QUE APRENDER SOBRE LOS BIOFILMS

Potera (1996) citado por Dreeszen P. (2003) afirma que los microbiólogos tradicionalmente se han centrado en el estudio del crecimiento de la bacteria planctónica en cultivos de laboratorio. Más tarde se darían cuenta que en la naturaleza, la mayor parte de las bacterias integran biofilms, una forma en la cual ellas tienen un comportamiento diferente. Como resultado, los biofilms son ahora uno de los más inquietantes temas a tratar por la microbiología. Deberíamos entender cómo se desarrollan los biofilms, algunos de los problemas que pueden causar, y cómo pueden ser controlados. Y necesitamos aprender sobre los biofilms porque nos asombrará la habilidad de la bacteria para adaptarse al medioambiente y evadir nuestros intentos para eliminarlos (Dreeszen P. 2003).

El Biofilm bacteriano apical es clínicamente importante porque los biofilms microbianos son inherentemente resistentes a los agentes antimicrobianos, no pueden ser removidos por la preparación biomecánica sola y pueden conducir a fracasos del tratamiento endodóntico como consecuencia de la infección persistente (Leonardo M. R. y col. 2002).

Donlan (2002) citado por Gonçalves J. (2007) afirma que recientemente ha surgido gran interés científico en el proceso de la formación de la biopelícula, debido a que se reconoce que este proceso de formación es un aspecto importante en la mayoría de las enfermedades bacterianas, incluyendo osteomielitis, caries, y diversas infecciones como aquellas relacionadas con equipos médicos, del oído medio, de implantes oculares y de pulmón en pacientes con fibrosis quística.

Los biofilms han sido observados en un número de lesiones de enfermedades bacterianas humanas. Algunos ejemplos incluyen infecciones de los tejidos orales blandos y de los dientes, así como del oído medio y del tracto gastrointestinal y urogenital. Los biofilms han sido también observados en dispositivos médicos invasivos tales como catéteres, implantes cardíacos y en tubos de ventilación de tráquea.

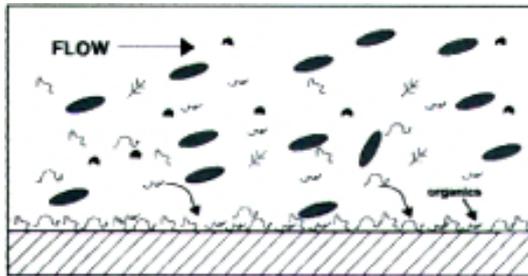
Caries dental y periodontitis marginal son causadas por el biofilm, y los biofilms están involucrados en osteomielitis, fascitis necrotizantes, fibrosis quística y prostatitis bacterianas (Distel J. y col. 2002; Gonçalves J. 2007; Noiri Y. y col. 2002).

#### IV | FASES DE LA FORMACIÓN

Mittelman (1985) citado por Dreeszen P. (2003) proponía que las fases se sucedían de la siguiente manera.

**Superficie condicionada:** las primeras sustancias asociadas con la superficie no son bacterias pero si rastros orgánicos. Casi inmediatamente después de que una superficie limpia entra en contacto con agua, una capa orgánica se deposita sobre la interfase agua/sólido. Dicen que los rastros orgánicos forman una capa "condicionada" la cual neutraliza la excesiva carga superficial y la energía superficial libre lo cual puede evitar que la célula bacteriana se aproxime lo suficientemente cerca como para iniciar la adhesión. Sumado a esto, las moléculas orgánicas absorbidas frecuentemente sirven como fuente nutritiva para la bacteria (Dreeszen P. 2003).

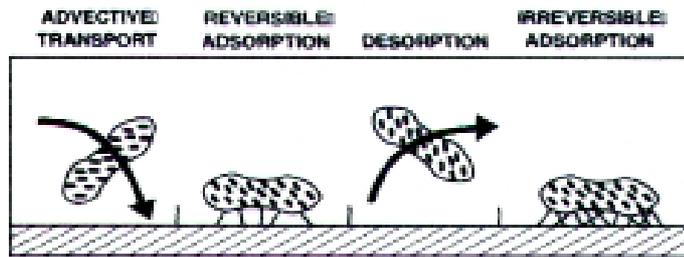
Svensäter G. y col et al (2004) citados por Gonçalves J. (2007) afirman que numerosos microorganismos en la fase planctónica son transportados a la superficie, pero son las propiedades de la película condicionada las que determinan cuáles microorganismos adjuntar y por lo tanto influencia la composición microbiana de la biopelícula (Gonçalves J. 2007).



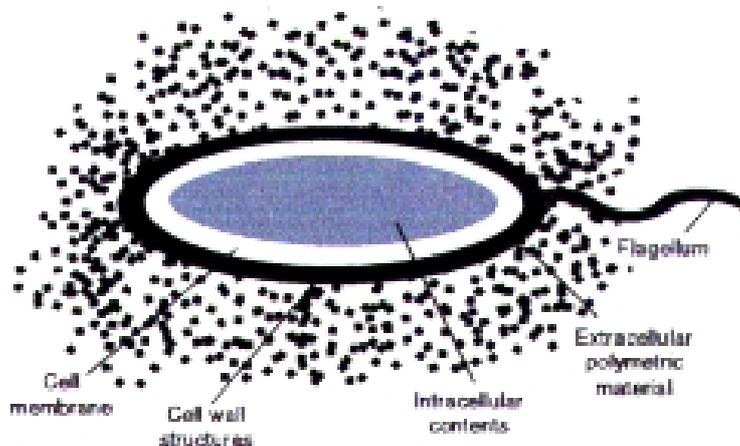
La adsorción de moléculas orgánicas sobre una superficie limpia forma una película condicionada (Characklis 1990).

**Adhesión de la bacteria pionera:** algunas bacterias planctónicas se aproximarán a la superficie condicionada y se embarcarán dentro de la capa divisoria, la zona calma en la superficie condicionada donde la velocidad de flujo cae a cero. Algunas de estas células se agolparán y se absorberán a la superficie por un corto tiempo, y luego abandonarán la superficie dejando de estar absorbidas. Esto se llama Adsorción Reversible. Esta adhesión inicial esta basada en fuerzas físicas y de atracción electrostática, no por uniones químicas. Algunas de estas células reversiblemente absorbidas comenzarán a prepararse para una larga permanencia formando estructuras las cuales pueden en forma permanente adherir la célula a la superficie. Estas células llegan a ser irreversiblemente absorbidas (Dreeszen P. 2003).

Transporte de las células bacterianas a la superficie condicionada, absorción, desabsorción e irreversible absorción (Characklis 1990).



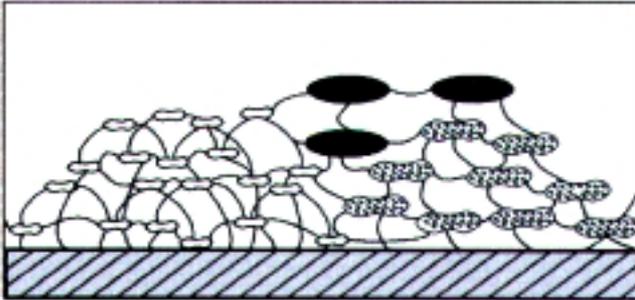
**Glicocaliz o formación del barro:** Las bacterias del biofilm excretan sustancias poliméricas extracelulares, o polímeros pegajosos, los cuales asirán el biofilm junto con el cemento a la superficie condicionada. Sumado a esto, estos polímeros entrapan escasas sustancias nutritivas y protegen a la bacteria de los agentes antimicrobianos. Mallete (1992) citado por Dreeszen P. (2003) dice que al mismo tiempo que se acumulan nutrientes, la célula pionera comienza a reproducirse. Las células hijas luego producen su propio glicocáliz, incrementando significativamente el volumen de cambio de iones de la superficie. Pronto se establece una colonia próspera de bacterias. Geesey (1994) citado por Dreeszen P. (2003) dice que en un biofilm maduro, gran parte del volumen es ocupado por una matriz organizada de glicocáliz sin apretamientos (75-95%) más que por células bacterianas (5-25%). Porque la matriz de glicocáliz retiene mucha agua, resulta que la superficie cubierta de biofilm es gelatinosa y deslizante. El biofilm esta construido por microbios y una telaraña de polímeros extracelulares.



Las bacterias salvajes son células "cabelludas" con polímeros extracelulares, los cuales se pegan a las superficies (Mittelman 1985).

**Colonizadores secundarios:** así como atrapa moléculas de nutrientes, el glicocaliz consigue atrapar otros tipos de células microbianas a través de refrenamiento físico e interacción electrostática. Así, estos colonizadores secundarios producen sus propios desechos, los cuales otras células usan luego a su turno.

**Biofilm en completo funcionamiento:** el biofilm ya maduro, funcionando completamente como tal, es como un tejido vivo sobre la superficie condicionada. Es un complejo, una comunidad metabólicamente cooperativa construida por diferentes especies, cada una viviendo en un "microlugar personalizado". Un biofilm puede extenderse por sus propias expensas, ordinariamente por división celular. Así como el biofilm crece a un espesor que le permite extenderse a través de la capa divisoria en el interior de zonas de flujo de significativa velocidad y mayor turbulencia, algunas células serán abandonadas (Dreeszen P. 2003).



Bacterias y otros microorganismos desarrollan colonias cooperativas o un "consorcio" dentro del biofilm. Un biofilm anaeróbico puede desarrollarse debajo de una capa aeróbica. El grosor del biofilm alcanzará un equilibrio cuando el agua al fluir separe las células extendiéndose hacia fuera en flujos turbulentos (Borenstein 1994).

Otros autores, Scheie A., Svensäter G. y Bergenholtz G. (2004) citados por Gonçalves J. (2007) afirman que la formación de la biopelícula ocurre en seis fases:

- 1\_ Adhesión inicial del microorganismo a la superficie: hay un prerequisite que es la presencia de microorganismos planctónicos
- 2\_ Colonización: la bacteria comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión formando una microcolonia
- 3\_ Co-Adhesión o co-agregación es el reconocimiento entre células, donde los organismos en la biopelícula pueden reconocer y adherirse a bacterias genéticamente distintas a través de adhesinas
- 4\_ Crecimiento
- 5\_ Maduración
- 6\_ Desprendimiento de algunos microorganismos de la matriz de la biopelícula para poder colonizar nuevas superficies

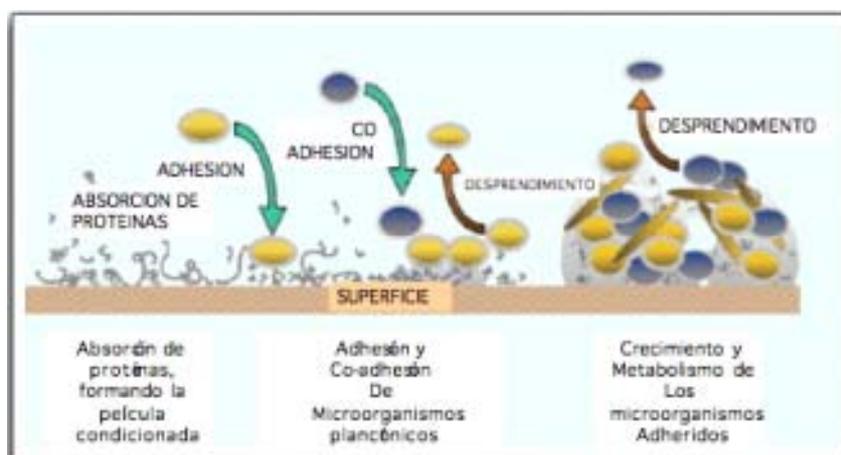


Diagrama de las Etapas de formación de la Biopelícula, tomado de Svensäter y Bergenholtz, 2004.

Durante el transcurso de cada una de estas fases, los microorganismos presentan una expresión de genes bien regulada (Gonçalves J. 2007).

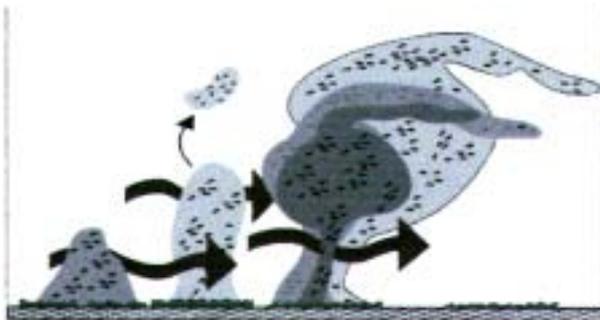
Durante la fase de adhesión se va a regular la expresión genética a través de sistemas de transducción por señales permitiendo la inducción o inhibición de genes. Lasa I y col et al (2005) citados por Gonçalves J. (2007) dicen que entre estos sistemas se encuentran los sistemas de dos componentes y los sistemas que responden a las señales en función de la densidad celular o quórum sensing. Todos estos sistemas actúan en la regulación de la virulencia, así como de la formación de la biopelícula, sirviendo de conexión entre ambos procesos (Gonçalves J. 2007; Serrano-Granger J. y Herrera D. 2005).

La proximidad de bacterias individuales en los biofilms también incrementa la oportunidad para la transferencia génica, haciéndole posible convertirse a un organismo previamente avirulento en un patógeno altamente virulento o una bacteria que es susceptible a los antimicrobianos en una resistente. Este potencial para la transferencia génica dentro de los biofilms es particularmente significativo en el caso del *Enterococcus Faecalis* debido a que un número de factores de virulencia del *Enterococcus F.* son codificados en plásmidos transmisibles. Estos incluyen, colagenasa, gelatinasa y adhesinas, todas con el potencial de contribuir a la supervivencia y colonización del conducto radicular (Distel J. y col. 2002).

## V | ESTRUCTURA

Donlan R. (2002) citado por Gonçalves J. (2007) afirma que la arquitectura de la biopelícula es heterogénea tanto en espacio como en tiempo, constantemente es cambiante debido a los procesos externos e internos y estando influenciada por la interacción con partículas del ambiente donde se desarrolle, por ejemplo como ocurre en el cuerpo humano, donde los eritrocitos y la fibrina se pueden acumular en el interior de las biopelículas (Gonçalves J. 2007).

Coghlan (1996) citado por Dreeszen P. (2003) dice que en el pasado, los microbiólogos asumieron que los biofilms contenían grupos de bacterias desordenados, no localizados en una particular estructura o modelo. Nuevas técnicas para ampliar el biofilm sin destruir estructuras tipo gel, les han permitido a los investigadores descubrir la compleja estructura de los biofilms como si estuvieran viendo una ciudad desde un satélite. Esta estructura se describe así: "en la mayoría de los casos, la base del biofilm es un lecho de barro denso, opaco de 5 a 10 micrómetros de grosor (197-394 micropulgadas). Esta es una mezcla pegajosa de polisacáridos, otras sustancias poliméricas y agua, todos ellos producidos por las bacterias. 100 a 200 micrómetros de altura hacia arriba, son colonias de bacterias formando conos (3940-7840 micropulgadas). Encima del nivel de la calle, viene más barro, esta vez, con una consistencia variable y más acuosa, con una red de canales a través de los cuales viajan el agua, desechos bacterianos, nutrientes, enzimas, metabolitos y oxígeno" (Dreeszen P. 2003).



Modelo conceptual de la arquitectura de un biofilm de especies únicas basado en la observación directa usando un microscopio confocal. Algunas microcolonias son simples estructuras cónicas mientras que otras son con forma de hongo champiñón. Corrientes de agua fluyen en canales entre las colonias transportando nutrientes y desechos (Costerton 1995).

Sutherland I. (2001) citado por Gonçalves J. (2007) afirma que aunque la composición de la biopelícula es variable en función del sistema en estudio, el componente mayoritario es el agua que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (Gonçalves J. 2007).

El biofilm está compuesto por partículas minerales, una variedad de microorganismos, y una red de barro o glicocáliz que atrapa microorganismos junto con partículas. El glicocáliz en el cual la bacteria vive, las protege de los efectos de

los antibióticos y explica la persistencia de la infección aún ante una vigorosa terapia con sustancias químicas

(<http://www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms/primer.html>).

Como consecuencia de su situación topográfica y de su composición química, el glicocáliz desempeña, de modo general, papel expresivo en la nutrición bacteriana, en la defensa de la célula a la agresión de agentes físicos y químicos, en el estímulo de respuesta inmune y en los mecanismos de patogenicidad (Estrela C. y Bammann L. L. 2005).

Los biofilms, conocidos también como placa, son complejas comunidades de bacterias embebidas en una matriz de polisacáridos. Suspendidas, bacterias planctónicas que se marchan o se unen al biofilm rodeando al biofilm. Las condiciones de crecimiento varían entre el medioambiente del biofilm y el de los organismos planctónicos. Por esta razón las proteínas expresadas por las bacterias del biofilm pueden diferir de aquellas expresadas por sus colegas planctónicas, y ambas, las bacterias del biofilm y las bacterias planctónicas pueden diferir de aquellas bacterias mantenidas en laboratorio. Los biofilms son estructuras altamente organizadas que consisten en grupos de bacterias con forma de hongo champignon, unidas por una matriz de carbohidratos y rodeada por canales de agua que transportan nutrientes y eliminan desechos. Las bacterias secuestradas en los biofilms son protegidas y frecuentemente mucho más difíciles de combatir que sus colegas planctónicas (Distel J. y col. 2002).

Landa AS (2004) citado por Serrano-Granger J. Y Herrera D. (2005) opinan que los exopolisacáridos representan el componente fundamental de la matriz y son producidos por las propias bacterias del biofilm. Los exopolisacáridos participan de forma fundamental en el desarrollo del biofilm, pues su intervención mantiene la integridad del todo. Pueden tener carga neutra o carga polianiónica, según el tipo de exopolisacárido, por lo que pueden interactuar con distintos antimicrobianos, de forma que estos últimos quedan atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias. Los propios exopolisacáridos producidos por unas bacterias pueden actuar como fuente de nutrientes para otras bacterias, de la misma forma, pueden atrapar otros nutrientes del medio y ofrecerlos a los distintos tipos bacterianos presentes en el biofilm, lo cual supone una ventaja para el desarrollo bacteriano. Los exopolisacáridos actúan también retirando desechos del medio, lo que también favorece el desarrollo bacteriano. La composición química y la estructura terciaria de los exopolisacáridos determinan la capacidad de adhesión de los mismos lo que a su vez favorece la adhesión de las bacterias a las superficies. Por último, los exopolisacáridos participan en funciones de protección de las bacterias pues evitan su desecación. Además, gracias a sus cualidades pueden "tamponar" la acción de distintos antimicrobianos. La pérdida o la alteración de un determinado polisacárido pueden alterar el biofilm, o incluso puede producir la desaparición del mismo (Serrano-Granger J. y Herrera D. 2005).

Millward y col et al (1989) citados por Burleson A. y col (2007) comunicaron que las bacterias del biofilm difieren en forma significativa su fenotipo si se lo compara con el de sus colegas planctónicas y son mucho menos susceptibles a la terapéutica antimicrobiana.

Mah et al y Stewart et al (2001) citados por Burleson A. y col (2007) describen potenciales mecanismos de resistencia del biofilm a los agentes antimicrobianos. Estos incluyen resistencia a la penetración del agente antimicrobiano a través de la matriz del biofilm; bacteria que entra en un no crecimiento, estado protector debido a una disminución de las concentraciones de sustrato nutritivo o incremento de la inhibición de acúmulo de productos de desecho.; y formación de bacterias en un único y altamente protegido estado fenotípico similar a una espora (Burleson A. y col. 2007).

Factores que contribuyen a la resistencia incluyen la impenetrable capa de polisacáridos sobre las bacterias del biofilm y la habilidad de las bacterias del biofilm para sobrevivir sin dividirse. Sumado a esto, las condiciones físicas disponibles para apoyar el crecimiento bacteriano, tales como ph, concentración de ión, disponibilidad de nutrientes y suministro de oxígeno, varía en las distintas partes del biofilm (Distel J. y col. 2002).

## **VI | RELACIÓN ENTRE NECROSIS PULPAR Y BIOFILM**

El tratamiento endodóntico de dientes con necrosis pulpar y lesión periapical crónica es menos exitoso que el de los dientes con pulpa vital o con necrosis pulpar sin lesión periapical radiográficamente visible. Estudios sobre la dinámica de la infección de los conductos radiculares muestran que ocurren mecanismos selectivos en los cuales ciertas especies microbianas sobreviven y se multiplican más fácilmente que otras. Esto es principalmente debido a factores tales como disponibilidad de nutrientes específicos y baja tensión de oxígeno en los conductos radiculares con tejido pulpar necrótico y lesión crónica periapical (Leonardo M. R. y col. 2002).

El objetivo de la terapia endodóntica es la remoción de todo tejido vital o necrótico, microorganismos y subproductos microbianos del sistema de conductos radiculares. La intrincada naturaleza de la anatomía del conducto radicular ha complicado el completo debridamiento de todas las áreas del conducto radicular. Istmos, aletas, aplanamientos, anastomosis y otras irregularidades dentro del conducto radicular ocultan tejido, microbios y detritos después de la instrumentación. Nair y col et al (2005) citados por Burleson A. (2007) observaron el estado microbiano de un sistema de conductos radiculares necróticos en primeros molares inferiores con periodontitis apical después de una terapia endodóntica de una sola sesión. Después de la remoción de los segmentos radiculares apicales y su evaluación utilizando luz correlativa y microscopía de electrón de transmisión, encontraron que 14 de 16 dientes tenían infección residual intraconducto. Ellos notaron que los microbios estaban localizados en sitios inaccesibles, istmos y conductos accesorios, como biofilms (Burleson A. y col. 2007).

En dientes con necrosis pulpar y una lesión crónica periapical radiográficamente visible o dientes con infecciones persistentes o infecciones resistentes a la terapia, se observan microorganismos en la totalidad del sistema de conductos radiculares incluyendo el lumen, conductos laterales, accesorios y secundarios, túbulos dentinarios, ramificaciones del delta apical, foramen apical, áreas de resorción del cemento apical y tejidos periapicales (Leonardo M. R. y col. 2002).

## VII | BIOFILM EN LAS INFECCIONES ENDODÓNTICAS

Cualquier microbio que infecte el conducto radicular puede desencadenar una inflamación periapical. Aunque las especies individuales constituyentes de la flora endodóntica suelen tener baja virulencia, en conjunto actúan como patógenas debido a una combinación de factores que incluyen:

1. interacciones con otros microorganismos presentes en el conducto que pueden conducir a sinergismo;
2. liberación de endotoxinas;
3. síntesis de enzimas que dañan los tejidos del huésped; y
4. capacidad para interferir y anular las defensas del huésped (Nair P. N. R. 2002).

Los microorganismos pueden desarrollar mecanismos de resistencia y evasión de la defensa inmunológica y sobrevivir en los tejidos periapicales, formando biofilms (Soares J. A. y col. 2006).

Costerton y col et al (1999) citados por Noiri Y. y col (2002) comunicaron que las infecciones del biofilm comparten características clínicas, y que los biofilms se desarrollan preferencialmente sobre superficies inertes o sobre tejido muerto y ocurren comúnmente sobre dispositivos médicos y fragmentos de tejido muerto tales como secuestro de hueso muerto. El concepto de biofilm infectado es relativamente nuevo en Endodoncia y hace suponer que microorganismos no vitales están presentes dentro de las lesiones periapicales en las infecciones crónicas periapicales (Noiri Y. y col. 2002).

El mecanismo de formación de la lesión periapical es complejo. Las endotoxinas y enzimas de las bacterias ejercen función primordial, siendo responsables por las reacciones que potencian la infección, promueven la inhibición de la quimiotaxia de los neutrófilos y fagocitosis, garantizan la migración de enzimas lisosómicas, participan en la respuesta inmunológica por activación del sistema complementario, inducen la producción de anticuerpos, además de interferir en la sensibilidad antibiótica, dando como resultado la permanencia de lesiones periapicales dolorosas (Estrela C. 2005).

Es sabido que las bacterias extrarradiculares pueden formar colonias o agregados donde ellas son rodeadas por material extracelular. Algunas veces estos agregados bacterianos tienen la forma de gránulos con diámetros de hasta 3 o 4 mm. Ellos son indicaciones de que la flora de las lesiones refractarias puede ser atípica. Por cierto, la flora del conducto radicular de un diente obturado donde el tratamiento ha fallado, difiere marcadamente de la flora de los conductos radiculares infectados de dientes no tratados (Titterud S. P. y col. 2002).

En general, los principales factores etiológicos de las patologías periapicales crónicas y refractarias son bacterias, sus productos metabólicos y detritos de tejido pulpar infectado que permanecen en los conductos laterales, en los túbulos

dentinarios o en huecos entre la pared del conducto radicular y los materiales de obturación endodóntica (Noiri Y. y col. 2002).

**Microorganismos implicados:** si bien la mayoría de los fracasos de la terapia conservadora del conducto radicular están relacionados con problemas en la instrumentación, bacterias resistentes a dicha terapia pueden también estar involucradas. Bacterias asociadas a fracasos endodónticos junto con infecciones pulpo-periapical refractarias a la terapia convencional representan los problemas bacteriológicos aún no resueltos en Endodoncia. Varios estudios demostraron que las infecciones endodónticas persistentes son frecuentemente causadas por el *Enterococcus Faecalis*. Los factores de virulencia de este microorganismo, tales como hemolisina, gelatinasa y sustancia de agregación enterococcal (EAS) juega un importante papel en la patogénesis bacteriana (Distel J. y col. 2002).

*Enterococcus F.* es uno de los organismos más interesantes relacionados a las enfermedades endodónticas postratamiento (Gonçalves J. 2007).

El 75% de las lesiones periapicales refractarias contienen *Stafilococcus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Enterococcus*, *Enterobacter* o especies de *Cándida* (Titterud S. P. y col. 2002).

En dientes con necrosis pulpar y resorción ósea, la microbiota presente en el sistema de conductos radiculares difiere de aquella presente en infecciones agudas. Bacterias gram negativas son más frecuentes que las gram positivas. Microorganismos facultativos o estrictamente anaerobios son más frecuentes que los aerobios y la presencia de bacilos y filamentos es equivalente a la de cocci. El tejido pulpar necrótico llega a ser un medioambiente favorable para la proliferación microbiana debido a la presencia de residuos orgánicos o nutrientes, los cuales actúan como sustrato o medio de cultivo (Leonardo M. R. y col.2002).

Desde una perspectiva ecológica, el objetivo principal de su estudio es presentar la evidencia de que la naturaleza de las infecciones endodónticas persistentes depende no de la robustez de los microorganismos en el sitio infectado, pero sí de su habilidad para adaptar su fisiología a las condiciones del nuevo medioambiente, puestas por el tratamiento. La visión ecológica sobre los problemas de infección persistente en Endodoncia sugiere que la acción de especies individuales en infecciones endodónticas persistentes es secundaria cuando se compara con los cambios de adaptación de una comunidad biofilm polimicrobiana sufriendo cambios fisiológicos y genéticos en respuesta a cambios en el medioambiente del conducto radicular (Chavez de Paz L. 2007).

Nair y col (2005) citados por Özok A.R. y col (2007) han mostrado que la instrumentación e irrigación con NaOCl elimina los biofilms en solo 12% de los conductos radiculares. Los biofilms moran en las zonas inalcanzables del sistema de conductos radiculares como istmos y ramificaciones. La sinergia en el crecimiento y la resistencia incrementada a los antimicrobianos en biofilms mixtos de *F.*

nucleatum y *P. micros* puede explicar la colonización de la dentina de conductos radiculares infectados por estas especies (Özok A. R. y col.2007).

La *P. Gingivalis* fue inmunohistoquímicamente detectada en todas las zonas de biofilms extrarradiculares. Estos hallazgos sugieren que *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *F. nucleatum* estaban asociadas con la formación de biofilms extrarradiculares y periodontitis refractaria periapical (Noguchi N. y col.2005).

Sunde P. y col et al (2002) citados por Gonçalves J. (2007) dicen que las especies de *Actinomyces* tienen un papel importante en el desarrollo de los gránulos de azufre en los granulomas periapicales, siendo unas bacterias pioneras para la posterior adhesión y establecimiento de otras bacterias en ese sitio, para formar biopelículas en forma de gránulos en los tejidos (Gonçalves J. 2007).

## VIII | SUSCEPTIBILIDAD A LA TERAPÉUTICA ENDODÓNTICA

**Instrumentación:** Wu M y col et al (2006) citados por Gonçalves J. (2007) afirman que es importante destacar que ninguna técnica de instrumentación disponible es capaz de remover toda la dentina infectada del conducto radicular; consecuentemente es probable que algunos microorganismos permanezcan en los túbulos dentinarios y otras variantes anatómicas después de la instrumentación (Gonçalves J. 2007).

El uso de ultrasonido ha sido propuesto como posible solución al problema del debridamiento y desinfección del sistema de canales radiculares. El uso de ultrasonido después de la completa instrumentación manual o rotatoria ha mostrado reducir el número de bacterias (Burleson A. y col.2007).

Cerca del 40 a 60% de los conductos aún contienen bacterias cultivables después de la preparación químico-mecánica con diferentes concentraciones de NaOCl. Esto es debido a que los instrumentos tienen un diseño y una rigidez que les permite actuar solo en el conducto principal, y a que el NaOCl permanece en el conducto por un periodo corto de tiempo, lo cual podría ser insuficiente para alcanzar otras áreas, incluyendo irregularidades, istmos, deltas apicales (Siqueira J. F. y col.2007).

**Sustancias irrigantes:** La acción de las limas y de las soluciones irrigantes tienen solo un efecto parcial y temporario sobre los microorganismos limitados al conducto radicular principal (Soares J. A. y col. 2006).

En pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica apical, el análisis con microscopio electrónico de scanner reveló que NaOCl tanto al 6 como al 3% fueron capaces de interrumpir y remover el biofilm; NaOCl al 1% seguida por MTAD fueron capaces de interrumpir el biofilm pero no de eliminar las bacterias; CHX al 2% no fue capaz de interrumpir el biofilm. NaOCl al 6% fue el único irrigante capaz tanto de dar bacterias no viables como de físicamente remover el biofilm (Clegg M. S. y col.2006).

Una apropiada preparación del conducto radicular e irrigación usando NaOCl y EDTA, son suficientes para la decontaminación del sistema de conductos radiculares durante el retratamiento endodóntico (Schirrmmeister J. F. y col.2007).

Análisis estadísticos mostraron que solo NaOCl al 5.25% puede disgregar y remover el biofilm todo el tiempo; sin embargo el tratamiento con tetraclean produjo un nivel alto de disgregación del biofilm en todos los intervalos de tiempo considerados comparándolo con el MTAD (Giardino L y col. 2007).

Probando el efecto de diferentes concentraciones de NaOCl, CHX y cetrimida, los resultados mostraron que todos los irrigantes tenían un efecto bactericida sobre facultativos aerobios-anaerobios y sobre microaerófilos y anaerobios obligados en

altas concentraciones y aun después de periodos cortos de contacto (D'Arcangelo C. y col. 1999).

El uso de irrigación activada por ultrasonido por 1 minuto, después de la limpieza y remodelado en forma manual/rotatoria de los conductos radiculares ha mostrado mejorar los valores de limpieza de conductos e istmus en términos de remoción de biofilm/detrimentos necróticos. Empíricamente esto debería mejorar los resultados clínicos de estos tipos de casos. Sin embargo va a ser necesaria mucha más investigación (Burlison A. y col. 2007).

**Medicación intraconducto:** El *Enterococcus Faecalis* parece ser altamente resistente a las medicaciones usadas durante el tratamiento y es uno de los pocos microorganismos que ha mostrado resistir el efecto antibacteriano del hidróxido de calcio. Hay una pequeña investigación que explica por qué el *Enterococcus Faecalis* es resistente a la terapia del conducto radicular. Según ella, es fácilmente destruido cuando crece in vitro pero llega a ser resistente cuando se presenta en el medioambiente del sistema de conductos radiculares. De esta manera, el *Enterococcus F.* debe sufrir algún tipo de cambio mientras esta en el sistema de conductos radiculares, posiblemente activando algún factor de virulencia que lo hace más resistente. Alternativamente éste puede formar un biofilm. El *Enterococcus Faecalis* es un streptococo anaerobio facultativo del grupo D, es un componente saprófito de la flora entérica. Puede ser encontrado tanto en una monoinfección como en asociación con una o más especies. No es propio de la cavidad oral, lo que indica que es una infección exógena la que puede entrar al conducto radicular, sobrevivir a la terapia medicamentosa intraconducto y luego persistir después de la obturación. Demostraron que en ambos períodos de incubación, de corto y largo plazo, el *Enterococcus F.* colonizó conductos radiculares medicados con posible formación de biofilm en los experimentos a largo plazo (Distel J. y col. 2002).

La persistencia del *Enterococcus F.* después del tratamiento del conducto radicular puede estar asociada con su capacidad para inducir reprecipitación de apatita en los biofilms maduros. La habilidad del *Enterococcus F.* para formar un biofilm calcificado sobre la dentina de los conductos radiculares puede ser un factor que contribuya a su persistencia después del tratamiento endodóntico (Kishen A. y col.2006).

Las bajas tasas metabólicas de células sedentarias en estructuras tipo biofilm pueden hacerlas menos susceptibles a las sustancias antimicrobianas; los miembros de las bacterias del biofilm podrían estar mejor equipados para bombear hacia fuera a los antibióticos antes de que ellos puedan causar daño; o los habitantes del biofilm pueden producir menos proteínas que son a las que apuntan los antibióticos convencionales. Además, las bacterias del biofilm cambian ADN mucho más rápidamente que lo que hacen las bacterias planctónicas, lo cual podría acelerar la transferencia de genes resistentes a los antibióticos en el biofilm periapical (Titterud. S. P. y col. 2002).

Después de una adecuada limpieza y remodelado de los conductos radiculares, se recomienda la aplicación de una preparación, usualmente con hidróxido de calcio que tiene una acción complementaria antiséptica sobre los microorganismos residuales en el sistema de conductos radiculares y en lagunas del cemento apical (Soares J. A. y col. 2006).

El uso de una medicación antibacteriana entre citas ha sido lo más recomendado para eliminar las bacterias no afectadas por la preparación químico-mecánica (Siquiera J. F. y col. 2007).

La medicación intraconducto con CHX no redujo la concentración de bacterias (Paquette L. y col. 2007).

El uso de MTA mezclado con "2% de CHX solo podría ser recomendado en áreas expuestas a mínimas fuerzas compresivas y ciertamente no antes de que las pruebas sean producidas asegurando que la clorhexidina no ejerce un efecto biológico negativo sobre los tejidos del huésped" (Holt D. M. Y col.2007).

La asociación de clindamicina con metronidazol redujo significativamente el número de células en biofilms de 1 día. Sin embargo de todas las medicaciones probadas solo medicaciones conteniendo clorhexidina al 2% fueron capaces de eliminar la mayor parte en los biofilms de Enterococcus F. de 1 y 3 días (Lima K. Y col. 2001).

Ferreira y col (2004) citados por Gonçalves J. (2007) reportan un caso de un diente con fístula y lesión periapical resistente al tratamiento. Durante el tratamiento de conductos se realizaron todos los esfuerzos para controlar la infección intraconducto, incluyendo instrumentación del foramen (permeabilización), irrigación con sustancias bactericidas y medicación intraconducto con hidróxido de calcio por un año; sin embargo la infección persistió activa, por lo que se recurrió al tratamiento quirúrgico y se evaluó con SEM el ápice del diente, evidenciando que la infección no estaba en un sitio accesible a la preparación químico-mecánica y a los medicamentos intraconducto.

Solo la Cirugía Apical provee una efectiva desorganización o eliminación de los microorganismos causantes, promoviendo la reparación en casos difíciles, lo cual fue demostrable en el control a los dos años donde se observó una reparación ósea exitosa (Gonçalves J. 2007).

## **IX | ANEXO – DISCUSIÓN**

La adherencia bacteriana puede no requerir una obvia capa de biofilm (Nishioka G. J. y col. 1988).

En la mayoría de los dientes obturados con lesiones periapicales resistentes a la terapia, los microorganismos pueden persistir y jugar un rol significativo en los fracasos endodónticos (Nair P. N. R. y col. 1990).

En ausencia de factores antimicrobianos, materiales de obturación que contienen sustancias irritantes pueden evocar una reacción de cuerpo extraño en el periapice conduciendo al desarrollo de lesiones periapicales asintomáticas que pueden seguir siendo refractarias a la terapia endodóntica por largos períodos de tiempo (Nair P. N. R y col. 1990).

Debido a que una densidad crítica de células se requiere para iniciar la formación del biofilm, la limitación de nutrientes o la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio podrían también haber contribuido a biofilms más pequeños y períodos de tiempo extendidos para su formación en los conductos radiculares medicados. Si el *Enterococcus F.* puede formar biofilms en los conductos radiculares, esto podría explicar su habilidad para persistir en ese medioambiente (Distel J. y col.2002).

Cuando el conducto radicular es adecuadamente instrumentado, desinfectado y obturado, estudios mostraron una tasa de éxito de los dientes con periodontitis apical de 80 a 90%. Esto significa que el 10 a 20 % de las lesiones periapicales no responden al tratamiento local del diente. Lo que no se sabe es si la falta de respuesta de las lesiones periapicales refractarias es debido a la inaccesibilidad de los microorganismos extraradiculares o a la presencia de una microbiota que es diferente de aquella normalmente encontrada en las infecciones endodónticas (Titterud S. P. y col. 2002).

Es razonable que las infecciones extraradiculares sean causadas durante la fase aguda de la periodontitis periapical. Sin embargo, desde el punto de vista del biofilm infeccioso, es posible infectar sitios extraradiculares con flora endodóntica tanto en la fase aguda como crónica porque los biofilms son resistentes a las respuestas inmunes del huésped y podría funcionar como un foco de infecciones agudas (Noiri Y. y col. 2002).

El microanálisis mostró un significativo aumento en los niveles de calcio en los biofilms formados bajo condiciones de privación de nutrientes para los anaerobios (George S. y col. 2005).

Los Bacteriophages son virus que infectan bacterias. Una ventaja del tratamiento empleando estos virus, comparados con los agentes antimicrobianos es que estos virus pueden replicarse en el sitio de infección y estar disponibles en abundancia

cuando sean requeridos. Producen enzimas que pueden degradar la matriz de polisacárido extracelular de los biofilms (Donlan R. 2006).

La formación de biofilms muestra ciertas características de supervivencia y virulencia bajo algunas situaciones (Duggan J. y col. 2007).

El agregado de NaOCl activado ultrasónicamente por un minuto mejoró significativamente los valores totales de limpieza de los conductos.

Los valores de limpieza de los conductos con instrumentación manual/rotatoria son mejores que aquellos demostrados por otros autores utilizando el método de preparación step-back.

Una completa remoción de tejido/biofilm/detritos provenientes de los istmos de los dientes es imposible con instrumentación manual o manual/rotatoria sola.

Se observó que a pesar de hacer una limpieza vigorosa, no siempre se lograba un completo debridamiento de los istmos. Algunos biofilms y detritos necróticos permanecían en los istmos estrechos. Sin embargo la irrigación ultrasónica fue significativamente mejor que la instrumentación manual/rotatoria sola. Aunque la aguja ultrasónica no fue colocada a la profundidad del límite de la preparación del conducto, la alta energía generada por la unidad del ultrasonido, y el uso del hipoclorito de sodio resultó en conductos estadísticamente más limpios. Una mejor limpieza de conductos e istmos puede ser posible si se utiliza ultrasonido por más tiempo. El uso de una aguja de irrigación ultrasónica permitía la continua deposición y renovación de la solución irrigante dentro del conducto, lo que difiere de estudios previos donde el irrigante era llevado solamente hacia la cavidad de apertura coronal. El depósito de solución irrigante fresca dentro del conducto radicular puede también haber contribuido a mejores valores de limpieza. Sin embargo los valores de limpieza de conductos e istmos nunca alcanzaron el 100% (Burleson A. y col. 2007).

Dougherty T y col (1998) citado por Gonçalves J. (2007) dicen que la terapia fotodinámica propuesta para la eliminación de biopelículas y que ha sido usada para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades no malignas, esta basada en el concepto de que agentes fotosensitivos no tóxicos sean localizados en ciertos tejidos y subsecuentemente activados por luz con una apropiada longitud de onda para generar oxígeno reactivo y radicales libres que son citotóxicos para las células del tejido blanco.

Soukos y col (2006) citados por Gonçalves J. (2007) concluyen que la terapia fotodinámica puede ser desarrollada como un procedimiento adjunto para eliminar los microorganismos residuales luego del tratamiento endodóntico convencional (Gonçalves J. 2007).

## X | CONCLUSIONES

En todo el planeta, los microorganismos siempre han existido bajo la forma de comunidades de biofilms, lo que explica por qué es considerado un hecho natural. Sin embargo el interés en estas estructuras ha ido creciendo significativamente por la repercusión e implicancias en el tratamiento endodóntico así como en muchas enfermedades bacterianas.

La Microbiología y la Ciencia Endodóntica se han esforzado en descifrar las incógnitas sobre el Biofilm Periapical y llegaron de alguna manera a concluir que:

- 1\_ El biofilm es un sistema biológico multifuncional interactivo donde cada microorganismo coopera con otros para formar una barrera que resista al sistema inmunológico como así también a los agentes antimicrobianos.
- 2\_ Estructuralmente, el biofilm es una compleja agregación de microorganismos unida a una superficie y embebidos en una rica matriz de polisacáridos extracelulares que ellos mismos producen y que les sirven de protección.
- 3\_ El biofilm puede localizarse dentro del sistema de conductos pudiéndose ocultar en diversas irregularidades anatómicas lo cual complicaría el tratamiento para erradicarlo, o también en la región periapical cuyo aporte nutritivo circulatorio, mucho más importante que el de la pulpa, le propiciará a los microorganismos una poderosa vía de difusión y diseminación para localizarse extrarradicularmente.
- 4\_ Cualquier microorganismo puede estar involucrado en la formación de un biofilm bajo condiciones ambientales adecuadas, sin embargo algunos son capaces de formar biofilms más fácilmente y por lo tanto resultan ser más patógenos.
- 5\_ La necrosis pulpar crea un ambiente propicio para la proliferación microbiana debido a que los residuos y toxinas actúan como sustrato promoviendo condiciones selectivas para la formación de biofilms.
- 6\_ Estamos seguros de la presencia de un Biofilm Periapical cuando nos encontramos con lesiones periapicales refractarias, en las que precisamente el *Enterococcus Faecalis* y la *Cándida Albicans* son los predominantes.
- 7\_ Una instrumentación adecuada acompañada por una irrigación abundante de NaOCl al 6 % activada por ultrasonido y con un largo período de contacto entre solución /paredes del conducto y una medicación intraconducto es garantía de un pronóstico favorable.
- 8\_ Los biofilms extrarradiculares no responden al tratamiento que se emplea para combatir aquellos que se localizan solo dentro del conducto, por lo tanto, la alternativa para ellos es la Cirugía Apical.

## XI | GLOSARIO

**Anfibiosis:** forma de vida, en este caso, de las bacterias que pueden vivir dentro y fuera del agua.

**Carga superficial:** el balance entre los números de cargas positivas y negativas expuestas a una superficie.

**CHX:** clorhexidina.

**Energía libre superficial:** el grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad de una superficie.

**Glicocáliz:** sustancia polimérica extracelular y pegajosa que la bacteria excreta para adherirse a las superficies sólidas y englobar nutrientes. Protege a las bacterias frente a los antimicrobianos.

**MTAD:** agregado de trióxidos minerales.

**NaOCl:** hipoclorito de sodio.

**Planctónica:** microorganismos libres flotantes cuyos movimientos son controlados por el movimiento del agua (no unidos a una superficie).

**Quórum sensing:** es un sistema que regula la expresión de ciertos genes de las bacterias a través de la acumulación de compuestos de señalización, lo que puede llegar a determinar mayor resistencia a un determinado antibiótico y hasta influir en la estructura del Biofilm.

**SEM:** microscopio de electrón de transmisión.

**Sesil:** unido a superficies sólidas (lo opuesto de planctónica).

## XII | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Burleson Aaron, Nusstein John, Beck Mike. The In Vivo Evaluation of Hand/Rotary/Ultrasound Instrumentation in Necrotic, Human Mandibular Molars. *J Endod.* 2007 July;33(7):782-787.
- (2) Chavez de Paz Luis. Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm Communities. *J Endod.* 2007 June;33(6):652-662.
- (3) Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod.* 2006 May;32(5):434-7.
- (4) D'Arcangelo Camillo, Varvara Giuseppe, and De Fazio Pietro. An Evaluation of the Actino of Different Root Canal Irrigants on Facultative Aerobic-Anaerobic, Obligate Anaerobic, and Microaerophilic Bacteria. *J Endod* 1999 May;25(5):351-353
- (5) Delzangles Bernard, DDS, Boy-Lefevre Marie-Laure, DDS, and Forest Nadine, DDS. Glycoproteins Expression in Apical Pathologic Tissues: Clinical Incidences. *J Endod* 1997 September;23(9):565-568
- (6) Distel John W, Hatton John F, and Gillespie M. Jane. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *J Endod* 2002 October;28(10):689-693
- (7) Donlan Rodney M. Controlling clinically relevant biofilms using bacteriophages. Web Site [www.BiofilmsOnline.com](http://www.BiofilmsOnline.com). *Biofilm Perspectives* 2006 April; No. 2006:02.
- (8) Dreeszen Paula. *Biofilm The Key to understanding and controlling bacterial growth in Automated Drinking Water Systems.* Second Edition. 2003 June:1-19
- (9) Duggan Jason M., DDS, Sedgley Christine M., PhD. Biofilm Formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007 July;33(7):815-518.
- (10) Estrela Carlos y Bammann Lili Luschke. Aspectos Microbiológicos en Endodoncia. *Ciencia Endodóntica* dirigido por Carlos Estrela. 1º Edición. Editorial Artes Médicas Latinoamericanas. 2005;5:148-174.
- (11) Estrela Carlos. Diagnóstico y Tratamiento de la Periodontitis Apical. *Ciencia Endodóntica* dirigido por Carlos Estrela. 1º Edición. Editorial Artes Médicas Latinoamericanas. 2005;6:175-233.
- (12) George S, Kishen A, and Song K P. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005 December;30(12):867-872
- (13) Giardino Luciano, Ambu Emanule, Savoldi Enrico, Rimondini Roberto, Cassanelli Clara, and Debbia Eugenio. A Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod* 2007 July;33(7):852-55.
- (14) Gonçalves Juan. Relevancia y participación de las biopelículas microbianas en las infecciones endodónticas. Web site [www.carlosboveda.com](http://www.carlosboveda.com) 2007 Junio.
- (15) Holt Dennis M, Watts J. Dustin, Beeson Thomas J, Kirkpatrick Timothy C, and Rutledge Richard E. The Anti-microbial Effect Against *Enterococcus faecalis* and the Compressive Strength of Two Types of Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Sterile Water or 2% Chlorhexidine Liquid. *J Endod* 2007 July;33(7):844-847.

- (16) <http://www.biofilmsonline.com/cgi-bin/biofilmsonline/ed> . How Bio films form. Educational Program Curricula and Teaching Resources. Supported in part by the Waksman Foundation for Microbiology developed in collaboration with Dr. John Lennox, Education Editor, Penn State Altoona Center for Biofilm Engineering, <http://www.erc.montana.edu>. 2002-2006.
- (17) <http://www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms/primer.html>. A Biofilm Primer.
- (18) Kaufman Blythe, Spangberg Larz, Barry Jody, and Fouad Ashraf F. Enterococcus Spp. In Endodontically Treated Teeth with and without Periradicular Lesions. J Endod 2005 December;31(12):851-856
- (19) Kishen A, George S, and Kumar R. Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. J Biomed Mater Res A. 2006 May;77(2):406-415.
- (20) Leonardo Mário R, Rossi Marcos A, Silva Léa A. B, Ito Isabel Y and Bonifácio Kleber C. EM Evaluation of Bacterial Biofilm and Microorganisms on the Apical External Root Surface of Human Teeth. J Endod 2002 December;28(12):815-818
- (21) Lima Kenio C, Fava Luis R. G, and Siquiera Jr. José F. Susceptibilities of Enterococcus faecalis Biofilms to Some Antimicrobial Medications. J Endod 2001 October;27(10):616-619
- (22) Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, and Torii M. Inflammatory Cytokine Production and Specific Antibody Responses to Lipopolysaccharide from Endodontopathic Black-Pigmented Bacteria in Patients with Multilesional Periapical Periodontitis. J Endod 1999 December;25(12)
- (23) Matsushita Kenji, Tajima Tomoe, Tomita Kouichi, Abeyama Kazuhiro, Maruyama Ikuro, Takada Haruhiko, and Nagaoka Shigetaka. Inflammatory Cytokine Production and Specific Antibody Responses against Possible Causative Bacteria in Patients with Multilesional Periapical Periodontitis. J Endod 1998 December;24(12):817-821
- (24) Nair P.N. Ramachandran and Schroeder Hubert E. Periapical Actinomycosis. J Endod. 1984 December;10(12):567-570
- (25) Nair P.N. Ramachandran, Sjögren Ulf, Krey Gunthild, and Sundqvist Göran. Therapy-resistant Foreign Body Giant Cell Granuloma at the Periapex of a Root-filled Human Tooth. J Endod. 1990 December;16(12):589-595
- (26) Nair P.N. Ramachandran, Sjögren Ulf, Krey Gunthild, Kahnberg Karl-Erik, and Sunqvist Göran. Intraradicular Bacteria and Fungi in Root-filled, Asymptomatic Human Teeth with Therapy-resistant Periapical Lesions: A Long- Term Light and Electron Microscopic Follow-up Study. J Endod. 1990 December;16(12):580-588
- (27) Nair P.N. Ramachandran. Fisiopatología del Periapice. Vías de la Pulpa dirigido por Stephen Cohen y Richard c. Burns. 8º Edición. 2002;12:449-492.
- (28) Nishioka GJ, Jones JK, Triplett RG and Aufdemorte TB. The role of bacterial-laden biofilms in infections of maxillofacial biomaterials. J Oral Maxillofac Surg. 1988 January;46(1):19-25.
- (29) Noguchi Nobuo, Noiri Yuichiro, Narimatsu Masahiro, and Shigeyuk. Identification and Localization of Extraradicular Biofilm Associated with Refractory Endodontic Pathogens. Appl Environ Microbiol. 2005 December;71(12):8738-8743.
- (30) Noiri Yuichiro, Ehara Atsushi, Kawahara Takashi, Takemura Naoki, and Ebisu Shigeyuki. Participation of Bacterial Biofilms in Refractory and Chronic Periapical Periodontitis. J Endod 2002 October;28(10):679-683

- (31)Özok Ahmet Rifat, Wu Min-Kai, Luppens Suzanne Bernardina Ida, and Wesselink Paul Rudolf. Comparison of Growth and Susceptibility to Sodium Hypochlorite of Mono- and Dual-Species Biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus(micromonas) micros*. J Endod 2007 July;33(7):819-822.
- (32)Paquette Lisane, Legner Milos, Fillery Edward D, and Friedman Shimon. Antibacterial Efficacy of Chlorhexidine Gluconate Intracanal Medication In Vivo. J Endod. 2007 July;33(7):788-795.
- (33)Schirrmeister Jörg F., Liebenow Anna-Lisa, Braun Gabriele, Wittmer Annette, Hellwig Elmar, Al-Ahmad Ali. Detection and Eradication of Microorganisms In Root-filled Teeth Associated With Periradicular Lesions: An In Vivo Study. J Endod. 2007 May;33(5):536-540.
- (34)Serrano-Granger Jorge, Herrera David. La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla?. RCOE 2005;10(4):431-439.
- (35)Siqueira José F. Jr, Guimarraes-Pinto Tatiana, RoÇas Isabela N. Effects of Chemomechanical Preparation UIT 2.5% Sodium Hypochlorite and Intracanal Medication With Calcium Hydroxide on Cultivable Bacteria in Infected Root Canals. J Endod. 2007 July;33(7):800-805.
- (36)Soares Janir Alves, Leonardo MR, Bezerra da Silva Lea A, Tanomaru Filho M, and Ito Izabel Koko. Effect od rotary instrumentation and of the association of calcium hydroxide and chlorhexidine on the antiseptis of the root canal system in dogs. Braz Oral Res. 2006;20(2):120-126.
- (37)Titterud Sunde Pia, Olsen Ingar, Debelian Gilberto J and Tronstand Leif. Microbiota of Periapical Lesions Refractory to Endodontic Therapy. J Endod. 2002 April;28(4):304-310.
- (38)Vigil Gary V, Wayman Blake E, Dazey Steve E, Fowler Craig B, and Bradley Donald V Jr. Identification and Antibiotic Sensitivity of Bacteria Isolated From Periapical Lesions. J Endod 1997 February;23(2):110-114
- (39)Waltimo Tuomas, Trope Martin, Haapasalo Markus, and Orstavik Dag. Infection Control and One Year Follow-Up of Periapical Healing. J Endod 2005 December;31(12):863-866