



# Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados: Revisión de la literatura

## *Clinical implications of Enterococcus faecalis microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review*

Cynthia Rodríguez-Niklitschek,\* Gonzalo H Oporto V<sup>§</sup>

### RESUMEN

La caries dental es una enfermedad altamente prevalente en el mundo. Una opción para tratar dientes ampliamente destruidos por caries dental es la realización de tratamientos de endodoncia. Aun cuando estas terapias tienen un pronóstico favorable en la mayoría de los casos, la literatura señala que existe la posibilidad de fracaso. Una de las principales causas de fracaso en los tratamientos de endodoncia es la permanencia de microorganismos en los canales radiculares. Dentro de las numerosas especies bacterianas existentes, una de las más frecuentemente encontradas en dientes con necrosis pulpar (sin historia previa de endodoncia) y la más aislada en aquellos con recidiva de infección (dientes con indicación de re-tratamiento) es *Enterococcus faecalis*. Estudiar y conocer la microbiología endodóntica es requisito fundamental para lograr un tratamiento de endodoncia exitoso en dientes desvitalizados. Surge así la necesidad de conocer el comportamiento de las bacterias dentro del sistema de canales radiculares, así como sus mecanismos de defensa y resistencia, para manejar de la mejor manera posible su interacción con el diente y lograr su eliminación. El siguiente artículo corresponde a una revisión bibliográfica de la literatura existente acerca de *Enterococcus faecalis*, sus características principales y mecanismos de resistencia. La búsqueda bibliográfica se realizó a través de bases de datos electrónicas (EBSCO, Cochrane, Medline y Lilacs), utilizando motores de búsqueda (Pubmed y Decs); se incluyeron artículos en inglés y español, publicados durante los últimos 30 años. De un total de 52 artículos, se seleccionaron 26, correspondientes a estudios experimentales y revisiones de literatura.

### ABSTRACT

Dental caries is a highly prevalent disease in the world. Endodontic treatment is an option to treat teeth widely destroyed by dental caries. Even though this type of therapy offers favorable prognosis in most cases, scientific literature suggests there is a possibility for failure. In endodontic treatments, one of the most prevalent causes for treatment failure is permanence of microorganisms within root canals. Among the numerous existing bacterial species, *Enterococcus faecalis* is one of the most frequently found in teeth with pulp necrosis (lacking previous history of endodontic treatment). It is equally the most frequently isolated species in teeth with infection recurrence (teeth exhibiting evidence of recurrent treatment). To achieve successful endodontic treatment in devitalized teeth it is of the utmost importance to study and be aware of endodontic microbiology. This leads then to the need of studying bacterial behavior within the system of root canals as well as their resistance and defense mechanisms in order to best manage their interaction with the tooth and achieve bacterial obliteration. The present article purports to offer a bibliographic review of existing literature on *Enterococcus faecalis*, its main characteristics as well as resistance mechanisms. Bibliographic search was conducted through electronic databases (EBSCO, Cochrane, Medline and Lilacs), using search engines (Pubmed and Decs). Included articles were written in Spanish and English and published during the last 30 years. Out of a total 52 articles, 26 were selected; they corresponded to experimental studies and literature reviews.

**Palabras clave:** *Enterococcus faecalis*, endodoncia, tratamiento de endodoncia fallido, infección endodóntica.

**Key words:** *Enterococcus faecalis*, endodontics, failed endodontic treatment, endodontic infection.

### INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de la cavidad oral son un problema de salud pública para muchos países del mundo. Dentro de las patologías más prevalentes se encuentra la caries dental. En Chile, el MINSAL (Ministerio de Salud de Chile) estableció que el 66% de la población nacional se encontraba afectada por caries dental.<sup>1-4</sup> Una opción para tratar dientes ampliamente destruidos por esta patología es la realización de tratamientos de endodoncia, cuyo objetivo principal

\* Escuela de Odontología, Cátedra de Endodoncia, Universidad Mayor sede Temuco, Temuco, Chile. Programa de Magíster en Odontología, Facultad de Odontología, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

§ Departamento de Odontología Integral Adultos, Facultad de Odontología, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Centro de Biología Molecular y Farmacogenética, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

es lograr una minuciosa limpieza mecánica y química del sistema de canales radiculares, para luego sellarlos tridimensionalmente con un material inerte y así prevenir su reinfección. Posterior a esto, se procede a la rehabilitación de la corona dentaria, con lo que se logra finalmente limitar el daño por caries dental y prevenir la pérdida de dientes. Aun cuando este tipo de terapias tienen un pronóstico favorable si se indican de forma adecuada, la literatura señala que existe la posibilidad de fracaso. Una de las principales causas de fracaso en los tratamientos de endodoncia es la remoción incompleta del tejido pulpar o de los microorganismos presentes en los canales radiculares. Estos microorganismos pueden haber sobrevivido a los procedimientos biomecánicos o haber invadido los canales radiculares a través de la filtración coronal en dientes con raíces obturadas.<sup>5</sup> Diversos estudios han revelado que la microbiota presente en los canales radiculares de raíces con tratamiento endodóntico difiere de la que normalmente se encuentra en los dientes no tratados.<sup>5</sup> Al analizar el factor microorganismos, la literatura señala que las bacterias más frecuentemente encontradas en tratamientos realizados por primera vez, así como en aquellos con recidiva de infección, se limitan a una variedad muy específica de microorganismos, donde predominan especies Gram-positivas anaerobias facultativas, especialmente *Enterococcus faecalis*.<sup>5</sup> Esta bacteria ha sido aislada tanto al interior del sistema de canales radiculares como en lesiones periapicales. También se ha encontrado en dientes infectados sin historia de tratamiento de endodoncia previo, pero donde se observa con mayor frecuencia es en dientes que han presentado recidiva, es decir, fracaso del procedimiento endodóntico.<sup>5-9</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica a través de la búsqueda de artículos científicos vía Internet, en bases de datos electrónicas como EBSCO, Cochrane, Medline y Lilacs, utilizando motores de búsqueda electrónica como Pubmed y Decs.

Para realizar la búsqueda se utilizaron las siguientes palabras claves: *Enterococcus faecalis*, endodontics, failed endodontic treatment, endodontic infection.

Se incluyeron estudios en inglés y español, publicados durante los últimos 30 años (1985 a 2014), de tipo experimental y revisiones de literatura. No se limitó la búsqueda por país ni por tipo de estudio. Los artículos, una vez descargados, se almacenaron en formato pdf para preservar su originalidad.

Para proceder a la selección se revisaron los abstracts y en caso necesario los artículos completos con

el fin de decidir si la información que contenían estaba o no relacionada con el objetivo del trabajo.

Tras la búsqueda inicial se localizaron 52 artículos, de los cuales se excluyeron 22 por no considerarse relevantes para el objetivo de esta revisión. Finalmente se seleccionaron 26 artículos.

## CAUSAS DE FRACASO ENDODÓNTICO

Las bacterias y sus productos son considerados agentes etiológicos primarios de necrosis pulpar y lesiones periapicales. Por esta razón, su completa eliminación es uno de los pasos más importantes del tratamiento de endodoncia.<sup>10</sup> En la mayoría de los casos, el fracaso del tratamiento se produce cuando los procedimientos realizados al interior de los canales radiculares no logran un nivel satisfactorio de control y eliminación de la infección. Dentro de las principales causas de fracaso del tratamiento endodóntico se ha descrito la eliminación incompleta del tejido pulpar y los microorganismos presentes en el sistema de canales radiculares.<sup>11,12</sup> En muchos casos, el desbridamiento completo de los canales infectados puede ser inalcanzable debido a la inaccesibilidad de los sitios de infección, por ejemplo, cuando existe presencia de canales accesorios a los cuales los instrumentos, la medicación o los irrigantes no pueden llegar.<sup>13</sup> En la mayoría de los casos, el fracaso del tratamiento de endodoncia es resultado de la acción de los microorganismos que persisten en la porción apical del sistema de canales radiculares, incluso en los dientes bien tratados. Se ha demostrado que parte del espacio del canal radicular a menudo permanece intacto durante la preparación químico-mecánica, independientemente de la técnica y de los instrumentos empleados. Zonas sin instrumentar pueden contener bacterias o restos de tejido necrótico, aunque la obturación de los canales radiculares parezca ser radiográficamente adecuada.<sup>14</sup>

Dentro del sistema de canales, las bacterias se encuentran ubicadas en áreas como istmos, ramificaciones, deltas, irregularidades de los canales y túbulos dentinarios.<sup>14-16</sup> Si la instrumentación biomecánica, los irrigantes o los medicamentos no son capaces de alcanzar dichos sitios, es probable que el suministro de nutrientes para las bacterias situadas ahí permanezca inalterado después de la terapia radicular. Sin embargo, las bacterias presentes en áreas tales como los túbulos dentinarios pueden tener un sustrato reducido drásticamente. En tales regiones anatómicas, las bacterias aisladas por el relleno radicular por lo general mueren. Pese a esto, algunas especies bacterianas pueden sobrevivir durante períodos relativamente lar-

gos. Así, si el relleno radicular falla, proporcionando un sello incompleto, la filtración de fluidos desde el tejido periapical puede proporcionar sustrato para el crecimiento bacteriano.<sup>14</sup> Lo mismo puede ocurrir si se produce alguna filtración desde coronal.

Según las condiciones presentes en los canales radiculares, ciertas bacterias son más capaces de sobrevivir y multiplicarse que otras. Así, aun cuando es posible encontrar anaerobios facultativos en dientes con necrosis pulpar, es más frecuente encontrar anaerobios estrictos en canales infectados de manera primaria (es decir, sin tratamiento endodóntico previo y con pulpa necrótica) y anaerobios facultativos en los casos de tratamientos de endodoncia fallidos.<sup>6,8</sup> La flora microbiana presente en los canales después del fracaso del tratamiento de endodoncia se limita a un pequeño número de especies microbianas, predominantemente Gram positivas. Anaerobios facultativos, especialmente *Enterococcus* spp, son los más frecuentes en estos casos<sup>6</sup> y entre ellos, *Enterococcus faecalis* es la especie más frecuentemente aislada.<sup>10,13,14</sup> Estudios han demostrado que la frecuencia de especies de *Enterococcus* en raíces obturadas que presentan periodontitis apical puede llegar incluso a un 70%.<sup>6,15-18</sup>

#### ROL DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EN EL FRACASO DEL TRATAMIENTO DE ENDODONCIA

El género *Enterococcus* corresponde a bacterias cocáceas, Gram positivas, del tipo anaerobios facultativos; son parte de la flora normal de la cavidad oral, del tracto gastrointestinal humano y del tracto genital femenino. Además, son causa bien reconocida de fracaso de tratamiento endodóntico y de algunas afecciones sistémicas, como infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, bacteriemia y endocarditis bacteriana.<sup>5,19</sup> Han desarrollado resistencia de alto nivel a los agentes antimicrobianos y poseen numerosos factores de virulencia tales como sustancias de agregación, proteínas de superficie, gelatinasa, producción de superóxido extracelular, polisacáridos capsulares y determinante de resistencia a los antibióticos. *Enterococcus* son reconocidos como potenciales patógenos humanos, causantes del 12% de las infecciones nosocomiales. De las especies de *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* es la más frecuentemente aislada en infecciones endodónticas recurrentes.<sup>8</sup>

La presencia frecuente de *Enterococcus faecalis* en canales radiculares donde el tratamiento de endodoncia ha fallado sugiere que es un patógeno oportunista cuya persistencia en los canales representa un pro-

blema terapéutico significativo. Una vez instalado en el sistema de canales, *Enterococcus faecalis* se enfrenta a varios desafíos para asegurar su supervivencia, incluyendo la capacidad de soportar la acción de los agentes antimicrobianos utilizados durante el tratamiento endodóntico y resistir a la falta de nutrientes en canales limpios y obturados.<sup>20</sup> Al analizar las posibles causas que llevan a encontrar esta bacteria en dientes que requieren tratamiento secundario de endodoncia, se sugieren dos: Una señala que *Enterococcus faecalis* posee la habilidad de colonizar e infectar los túbulos dentinarios, lo que complica su eliminación a través de la limpieza mecánica y química, dado el diámetro reducido de estas estructuras anatómicas,<sup>20,21</sup> junto con la capacidad que estas bacterias presentan para unirse al colágeno.<sup>8</sup> Otra posible causa es la potencial resistencia que estas bacterias podrían tener al hidróxido de calcio, medicación antibacteriana más comúnmente utilizada al interior del sistema de canales radiculares durante la terapia endodóntica,<sup>22</sup> lo que permitiría a estos microorganismos permanecer en estado quiescente.<sup>7,8,13,20,21</sup> La persistencia de *Enterococcus faecalis* se ha atribuido a su capacidad para resistir el elevado pH del hidróxido de calcio, el cual frecuentemente se introduce en los canales y se mantiene en ellos durante al menos una semana.<sup>23</sup> La resistencia de este microorganismo puede estar influenciada por los efectos de tamponamiento de la dentina, de modo que el aumento de pH no se puede lograr dentro de los túbulos dentinarios,<sup>13</sup> en cuyo interior puede habitar esta bacteria. Además de este hecho, la investigación de las posibles causas que producen resistencia de *Enterococcus faecalis* al hidróxido de calcio, señala que la expresión de determinados genes de esta bacteria, así como el funcionamiento de una bomba de protones, juegan un rol preponderante en este fenómeno.<sup>13,20</sup>

#### MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* A ANTIMICROBIANOS

La actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio se sustenta en la liberación de iones de hidróxido,<sup>24</sup> los cuales son capaces de generar numerosas alteraciones en el entorno acuoso de la célula y generar cambios nocivos en la estructura de membrana, afectando finalmente el ADN bacteriano. Cuando las células de *Enterococcus faecalis* entran en su fase de latencia, poseen una mayor resistencia al efecto antibacteriano del hidróxido de calcio, a través de un mecanismo que aún no ha sido dilucidado completamente. Aunque se ha documentado que *Enterococcus faecalis* puede

soportar el alto pH del hidróxido de calcio, se sabe relativamente poco acerca de los mecanismos de supervivencia que le permiten tolerar esta exposición. Curiosamente, la resistencia a la destrucción por hidróxido de calcio observada en *Enterococcus faecalis* se comparte con otros microorganismos que han sido asociados con el fracaso en endodoncia, tales como especies de *Candida* y *Actinomyces*.<sup>20</sup>

La capacidad para sobrevivir en condiciones adversas es importante para la mayoría de las bacterias, debido a los largos períodos de inanición que comúnmente experimentan. Varios sistemas de regulación desempeñan papeles esenciales en la capacidad de las bacterias para soportar el agotamiento de nutrientes. Estos sistemas están bajo el control de determinados genes, cuya transcripción se activa bajo condiciones de inanición.<sup>14</sup>

En general, cuando las bacterias se enfrentan a un agente adverso o potencialmente letal, se activa una respuesta de estrés que les permite soportar la amenaza, sobrevivir y recuperarse.<sup>25,26</sup> Cuando se induce esta respuesta, dicho estado puede conferir una protección general contra una variedad de otros factores de estrés; por ejemplo, una respuesta de estrés inducida por falta de nutrientes puede proporcionar protección contra la exposición al calor. *Enterococcus faecalis* es capaz de sintetizar una amplia variedad de proteínas cuando se expone a condiciones ambientales adversas, como son un ambiente con un pH alto o la exposición a hipoclorito de sodio (irrigante utilizado en endodoncia). Si la falta de nutrientes, la exposición a solución de hipoclorito de sodio o al hidróxido de calcio inducen a *Enterococcus faecalis* a generar una respuesta de estrés, entonces esta puede conferir protección cruzada para ésta bacteria cuando se ve expuesta posteriormente, por ejemplo, a una nueva medicación con hidróxido de calcio,<sup>20</sup> mecanismo que podría explicar en parte su resistencia.

Estudios han demostrado que a un pH 11,5 o mayor, *Enterococcus faecalis* no puede sobrevivir; sin embargo, sí puede hacerlo a concentraciones menores.<sup>20,27</sup> Debido al efecto buffer de la dentina, es poco probable que el pH alto del hidróxido de calcio alcance los túbulos dentinarios, donde *Enterococcus faecalis* tiene la capacidad de penetrar profundamente.<sup>28</sup> Aunque el pH de las pastas de hidróxido de calcio utilizado en endodoncia generalmente es 12,3 en la dentina radicular, la alcalinidad alcanzada no excede al pH 10,3 después de cubrirse los canales con hidróxido de calcio;<sup>21</sup> este valor puede caer incluso a pH 8,5-9,0 dentro del sistema de canales radiculares debido al efecto de tamponamiento de la dentina, valor que no es lo suficientemente alto como para erradicar a

*Enterococcus faecalis*.<sup>29</sup> Por otra parte, dado que el tratamiento endodóntico en general incluye el uso alternado de medicamentos en diversas etapas de la instrumentación radicular, *Enterococcus faecalis* se expone frecuentemente a un pH alcalino «subletal», lo que podría hacer que las células bacterianas generen una respuesta de estrés que mejore su supervivencia. Así, la exposición repetida de *Enterococcus faecalis* a la solución de hipoclorito de sodio e hidróxido de calcio podrían inducir mecanismos de resistencia frente a la exposición subsiguiente, incluso a niveles que podrían ser letales.<sup>20</sup> Además de la respuesta adaptativa en un pH alcalino y la síntesis de proteínas inducida por el estrés, también se ha descrito la existencia en estas bacterias de una bomba de protones con la capacidad de acidificar el citoplasma, mecanismo que sería clave para la supervivencia de *Enterococcus faecalis* a pH alto, siendo incluso más importante que los mecanismos adaptativos señalados anteriormente.<sup>20</sup> El mecanismo de funcionamiento de esta bomba de protones consiste básicamente en una respuesta de la bacteria a la penetración de iones hidroxilo al citoplasma bacteriano, los cuales elevarían el pH intracelular. Ante esto, la bomba de protones se activa y responde enviando iones potasio (cargados positivamente) hacia el citoplasma bacteriano, logrando así su acidificación e impidiendo la ocurrencia de la inhibición enzimática.<sup>29</sup>

Dependiendo de la disponibilidad de nutrientes en el sistema de canales y la capacidad para sobrevivir en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, los microorganismos que permanezcan al interior de los canales radiculares pueden morir o seguir siendo viables. En caso de mantenerse viables, su proliferación puede ser impedida o reducida. Pese a los mecanismos de resistencia señalados con anterioridad, el fracaso del tratamiento endodóntico atribuido a microorganismos residuales sólo se producirá si éstos poseen patogenicidad, alcanzan un número suficiente y tienen acceso a los tejidos peripapcales para inducir o mantener la enfermedad perirradicular.<sup>14</sup> Por otra parte, la variación de la resistencia al pH alcalino puede estar relacionada con la existencia de genotipos variables entre cepas de *Enterococcus faecalis*, es decir, pueden ocurrir variaciones genéticas de las cepas de *Enterococcus faecalis* en el tiempo, que generen fenotipos de mayor resistencia al pH alcalino.<sup>30</sup>

## CONCLUSIONES

El frecuente hallazgo de *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes con endodoncias fallidas implica que esta especie está íntimamente involu-

crada en la patogénesis y la persistencia de la periodontitis apical. Así, esta bacteria es frecuentemente aislada, tanto en casos de infecciones endodónticas primarias como secundarias, por lo que resulta necesario realizar nuevas investigaciones que permitan conducir a la elaboración de antimicrobianos más eficaces para ser utilizados durante el tratamiento de endodoncia.

Es importante señalar que la supervivencia de *Enterococcus faecalis* en los canales radiculares se debe a que los irrigantes o medicamentos utilizados durante la etapa de instrumentación no son capaces de acceder a todo el sistema de canales, o a que la obturación radicular no es capaz de lograr un sellado tridimensional completo, quedando lugares en donde estos microorganismos pueden ocultarse y sobrevivir, como es el caso de los túbulos dentinarios, por lo que junto con encontrar mejores y más efectivos medicamentos endodónticos, se debe poner énfasis en la búsqueda de sistemas de obturación cada vez más eficientes y efectivamente tridimensionales.

Un punto importante a evaluar es la importancia clínica de los mecanismos de resistencia antibacteriana de *Enterococcus faecalis*. Se ha demostrado que esta bacteria es resistente al efecto antimicrobiano de diversos medicamentos, incluyendo hidróxido de calcio. Por lo tanto, cuando *Enterococcus faecalis* se establece en el sistema de canales, su erradicación por medios convencionales puede ser extremadamente difícil. Así, sería interesante ahondar en la búsqueda de nuevos medicamentos que puedan ser utilizados solos o asociados con hidróxido de calcio, o bien determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de distintos medicamentos, a fin de obtener mejores resultados clínicos. Vale la pena señalar lo importante que es, tanto como la desinfección de los canales radiculares y su obturación completa, la colocación de un buen sellado coronal inmediatamente después del tratamiento endodóntico, y su reemplazo oportuno por una restauración definitiva para prevenir la reinfección microbiana del sistema de canales.

Aunque se ha demostrado que *Enterococcus faecalis* se encuentra presente en la mayoría de los casos de canales infectados (principalmente con indicación de retratamiento de endodoncia), su papel en la patogénesis de las enfermedades periağıales asociadas con pulpa necrótica o fracaso endodóntico, no está completamente claro. Aun cuando *Enterococcus faecalis* posea capacidad de resistir a la medición utilizada en endodoncia, no debe desestimarse la posibilidad de que existan cepas más resistentes que otras y que puedan sobrevivir en condiciones extremas. Asimismo, la identificación de genes expresa-

dos por las células de esta bacteria durante la fase estacionaria podría permitir el desarrollo de protocolos de tratamiento que puedan erradicar definitivamente a *Enterococcus faecalis* de los canales radiculares infectados.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de una investigación financiada con fondos adjudicados al proyecto FIDUM OI 100513. Dirección de Investigación, Universidad Mayor sede Temuco, Chile.

## REFERENCIAS

1. Urbina T, Caro JC, Vicent M. Caries dentaria y fluorosis en niños de 6 a 8 y 12 años de II, RM, VI, VIII, IX y X regiones. MINSAL. 1996. Facultad de Odontología Universidad de Chile.
2. Urbina T, Caro JC, Vicent M. Caries dentaria y fluorosis en niños de 6 a 8 y 12 años de I, III, IV, VII, XI y XII Regiones. MINSAL. 1997. Facultad de Odontología Universidad de Chile.
3. Urbina T, Caro JC, Vicent M. Caries dentaria y fluorosis en niños de 6 a 8 y 12 años de la V Región. MINSAL. 1999. Facultad de Odontología Universidad de Chile.
4. Linossier A, Vargas A, Zillmann G. *Streptococci mutans*: método semicuantitativo para establecer el rango de riesgo de infección bucal en niños preescolares Chilenos. Revista Médica de Chile. 2003; 131 (4): 412-418.
5. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18 (2): 100-103.
6. Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102 (2): 247-53. Epub 2006 Jun 8.
7. Reynaud AF, Geijersstam AH, Ellington MJ, Warner M, Woodford N, Haapasalo M. Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. Oral Microbiol Immunol. 2006; 21 (3): 164-168.
8. Ozbek SM, Ozbek A, Erdorgan AS. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. J Appl Oral Sci. 2009; 17 (5): 370-374.
9. Zhang C, Hou BX, Zhao HY, Sun Z. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. Chin Med J. 2012; 125 (6): 1163-1168.
10. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003; 36: 1-11.
11. Al-Qudah A, Awawdeh L. Root and canal morphology of mandibular first and second molar teeth in a Jordanian population. Int Endod J. 2009; 42: 775-784.
12. Abella F, Mercadé M, Duran-Sindreu F, Roig M. Managing severe curvature of radixentomolaris: three-dimensional analysis with cone beam computed tomography. Int Endod J. 2011; 44 (9): 876-885.
13. Appelbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22 (3): 169-174.

14. Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail (Literature review). *Int Endod J.* 2001; 34: 1-10.
15. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gaengler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histopathological study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1991; 71: 603-611.
16. Siqueira JF Jr, De Uzedo M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of *in vitro* dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996; 22: 308-310.
17. Peciuliene V, Balciuniene, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod.* 2000; 26: 593-595.
18. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001; 34: 429-34.
19. Tong Z, Huang L, Ling J, Mao X, Ning Y, Deng D. Effects of intra-canal irrigant MTAD Combined with nisin at sub-minimum inhibitory concentration levels on *Enterococcus faecalis* growth and the expression of pathogenic genes. *PLoS One.* 2014;9(3): e90235.
20. Evans M, Davies J.K, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35 (3): 221-228.
21. Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y et al. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21 (5): 283-288.
22. Jahromi M, Toubayani H, Rezaei M. Propolis: a new alternative for root canal disinfection. *Iran Endod J.* 2012; 7 (3): 127-133.
23. Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991; 24: 119-125.
24. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982; 47: 412-426.
25. Parsell D, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics.* 1993; 27: 437-496.
26. Welch W. How cells respond to stress. *Scientific American.* 1993; 268: 56-64.
27. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endodontics and Dental Traumatology.* 1985; 1: 170-175.
28. Peters L, Wesselink P, Moorer W. Penetration of bacteria in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J.* 2000; 33: 28-36.
29. Weckwerth PH, Zapata RO, Vivan RR, Tanomaru Filho M, Maliza AG, Duarte MA. *In vitro* alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J.* 2013; 24 (5): 474-476.
30. ZareJahromi M, Toubayani H, Rezaei M. Propolis: a new alternative for root canal disinfection. *Iran Endod J.* 2012; 7 (3): 127-133.

Dirección para correspondencia:

**Cynthia Rodríguez Niklitschek**

E-mail: cynthia.rodriguez@mayor.cl