



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La importancia del biofilm y su eliminación en endodoncia

Gómez Álvarez, G., Gómez Martín, C., Mena Álvarez, J.
La importancia del biofilm y su eliminación en endodoncia. Cient. Dent. 2015; 12; 1: 39-44.



Gómez Álvarez, Gonzalo
Odontólogo. Máster Universitario en Endodoncia. Universidad Alfonso X el Sabio. Madrid.

Gómez Martín, Carlos
Odontólogo. Máster Universitario en Endodoncia. Universidad Alfonso X el Sabio.

Mena Álvarez, Jesús
Doctor en Odontología. Director Académico del Máster Universitario en Endodoncia. Universidad Alfonso X el Sabio. Madrid.

Indexada en / Indexed in:
- IME
- IBECS
- LATINDEX
- GOOGLE ACADÉMICO

correspondencia:
Jesús Mena Álvarez
C/ Albarracín, 35
28037 Madrid
jmenaalvarez@gmail.com
Tel.: 914 402 330

Fecha de recepción: 24 de agosto de 2014.
Fecha de aceptación para su publicación:
29 de enero de 2015.

RESUMEN

Los biofilms bacterianos son sistemas complejos en los que las bacterias son capaces de organizarse, logrando así una mayor resistencia a los ataques antimicrobianos siendo mucho más difícil su erradicación. Las bacterias se encuentran en un 99% de las ocasiones formando biopelículas o biofilms, por tanto el conocimiento de cómo poder eliminarlos será la clave, no sólo en endodoncia, sino en cualquier disciplina.

Se ha investigado cómo es la mejor manera y cuáles son los mejores irrigantes en endodoncia para conseguir eliminar los biofilms intrarradiculares. El hipoclorito sódico, debido a su capacidad inherente de disolución del tejido, es capaz de desorganizar la estructura de los biofilms y los estudios revisados lo colocan como el mejor irrigante en endodoncia; la irrigación ultrasónica pasiva, el uso del láser y la terapia fotodinámica, son grandes aliados que actúan como coadyuvantes en la erradicación del biofilm.

Esta revisión bibliográfica nos ayuda a comprender cómo debemos centrarnos en la eliminación de los biofilms y no de bacterias aisladas; el *E. faecalis* es la bacteria principalmente relacionada con el fracaso endodóntico, poseyendo muchos factores de virulencia y una resistencia mediada por la formación de biofilms. Una adecuada irrigación con hipoclorito sódico (NaOCl) y el uso de quelantes del calcio como el ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) mejorará sobremanera la erradicación bacteriana dentro de los conductos.

PALABRAS CLAVE

Biofilm; Biofilm intrarradicular endodoncia; *Enterococcus faecalis*; Asepsia; Irrigación; Activación.

IMPORTANCE OF BIOFILM ERADICATION IN ENDO-DONTICS

ABSTRACT

Biofilms are complex systems where bacteria are able to organize, becoming more resistant to the attack of antimicrobials, being very difficult their elimination. Bacteria in nature are found in a 99% forming biofilms, so we have to understand that knowing how to eradicate them will be the key, not only in endodontics, otherwise in all other disciplines.

The best way and what are the best endodontic irrigants have been investigated to get the biofilms eradication. The sodium hypochlorite, because of its capability of tissue dissolution, it is able to disorganize the internal structure of biofilms and all the checked studies confirms it as the best endodontic irrigant; passive ultrasonic irrigation, laser and photodynamic therapy, are big allies acting as adjuvants in biofilms eradication.

This bibliographic revision helps us to understand how we must get biofilms elimination instead of isolated bacteria; *E. faecalis* is the most common bacteria found in endodontic failure, having a lot of virulence factors and a high resistance mediated by biofilm creation. Adequate irrigation with sodium hypochlorite and the use of calcium chelants like EDTA will improve the bacterial eradication inside the root canals.

KEY WORDS

Biofilm; Root canal biofilm; Endodontics; *Enterococcus faecalis*; Asepsis; Irrigation; Activation.

¿QUÉ ES UN BIOFILM? IMPORTANCIA DE SU ELIMINACIÓN

Uno de los mayores avances en microbiología que han sido realizados en los últimos años ha sido el estudio y conocimiento sobre el desarrollo de comunidades de microorganismos en diferentes superficies formando biopelículas o biofilms.

Un biofilm se define como "una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas han producido, exhibiendo un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción genética"¹, pudiendo estar formados éstos por una o más especies de diferentes géneros, aunque presentan similitudes en cuanto a las características estructurales y comportamiento biológico.

Podemos dividir la apariencia en la naturaleza de las bacterias en dos formas:

1. Bacterias planctónicas: suspendidas en un fluido.
2. Bacterias sésiles: adheridas a superficies duras, formadoras de biofilms. A este grupo corresponden el 99% de las bacterias.

Los biofilms constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que permite a las bacterias sobrevivir en determinados ambientes, confiriendo un mecanismo de defensa para las mismas, siendo a su vez su comportamiento y fisiología significativamente diferentes de aquellas bacterias que viven suspendidas en fluidos.

Hay que comprender que los biofilms son sistemas complejos desde el punto de vista estructural y dinámico, no son únicamente agregados pasivos de células que están adheridos a una superficie².

Existen numerosos estudios de acción de antimicrobianos frente a bacterias aisladas, comprobando su eficacia frente a estos microorganismos; sin embargo, la formación de biofilms confiere defensa a la comunidad celular, provocando menor respuesta de las sustancias antimicrobianas. Diversas publicaciones en la literatura hablan de que la mayoría de los procesos infecciosos bacterianos en seres humanos son provocados por la formación de biofilms, siendo alrededor del 65% en frecuencia³⁻⁵.

¿CÓMO SE DESARROLLA UN BIOFILM?

El desarrollo de un biofilm puede ocurrir de tres maneras distintas⁶⁻⁸:

1. División de las células adheridas
2. Redistribución de las células mediante movilidad superficial, es decir, las células hijas jóvenes se desplazan hacia la superficie formando cúmulos celulares de manera similar a cómo crecen las colonias en las placas de agar.

3. Captación de células planctónicas (en suspensión en un fluido) hacia un biofilm ya formado.

Etapas en la formación de un biofilm⁹⁻¹⁴

1. Adsorción, sobre una superficie dura, de proteínas y sustancia orgánica. La materia orgánica es adsorbida sobre las superficies formando la conocida "conditioning film" o película acondicionante, modificando las propiedades químicas y físicas del sustrato propiciando un entorno óptimo para la adhesión de bacterias.
2. La segunda etapa corresponde a la adhesión reversible de los microorganismos, realizada mediante fuerzas de Van Der Waals y fuerzas electrostáticas.
3. Adhesión irreversible de los microorganismos, exudando las mismas un material polimérico extracelular que llamaremos exopolisacárido (EPS). Éste material polimérico está constituido por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Se produce una transición de una interacción débil hasta un enlace permanente, mediado por polímeros y apéndices extracelulares, propiciando una unión específica entre adhesinas bacterianas y un receptor del sustrato. En diversos estudios se ha visto que polisacáridos y proteínas pueden actuar como adhesinas bacterianas.

Los EPS constituyen principalmente la matriz extracelular de los biofilms; las especies bacterianas que no producen los EPS son menos adherentes y menos patógenas. Se ha demostrado que la producción de los EPS es importante en la conexión intercelular, protección contra la fagocitosis, interferencia contra la respuesta inmune del huésped y una reducción de la eficacia de los agentes antimicrobianos.

4. Maduración del biofilm: corresponde con la creación de una arquitectura compleja, con poros y canales, produciendo una redistribución bacteriana; la densidad y complejidad de los biofilms aumenta a medida que los organismos adheridos se reproducen y mueren y los componentes extracelulares interactúan con moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio.
5. Desprendimiento de algunas células de la superficie del biofilm, creando canales dentro de la estructura del biofilm (Figura 1).

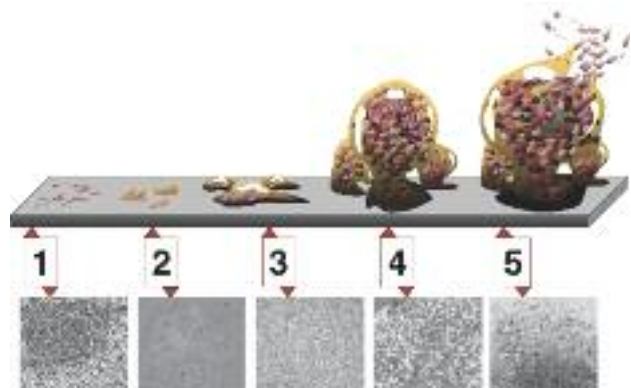


Figura 1. Etapas en la formación de una biofilm.

Resistencia de los biofilms¹⁵⁻¹⁹

Los estudios han demostrado que las bacterias en los biofilms pueden llegar a ser entre 10 y 1.000 veces más resistentes que las células aisladas, a un gran número de antibióticos como la ampicilina, estreptomycin, tetraciclinas, gentamicina, etc. y antisépticos oxidantes como los que son a base de cloro, yodo u ozono.

Los biofilms presentan diversos mecanismos de resistencia:

- Degradación de agentes antimicrobianos y penetración restringida de los mismos: La presencia de EPS de la matriz de los biofilms provoca la restricción en la entrada de los agentes antimicrobianos dentro del biofilm; esta limitación en la difusión de sustancias protege a las bacterias de su interior de la acción de estos agentes. Además, la unión del antimicrobiano a bacterias externas proporciona una efectiva resistencia a las células del interior del biofilm.
- Baja tasa de crecimiento dentro del biofilm: la mayoría de los antibióticos son más efectivos contra células en crecimiento; este motivo provoca que la disminución de la tasa de crecimiento en el interior del biofilm es una estrategia efectiva para la supervivencia de dichas células. Además, el gradiente de la concentración de oxígeno y el pH contribuyen indirectamente a la disminución de la tasa de crecimiento.
- Cambios fenotípicos: la expresión de genes por parte de las bacterias como respuesta a cambios de temperatura, baja disponibilidad de oxígeno, oxidación, daños en el ADN, se transfieren entre ellas consiguiendo un mecanismo de supervivencia específico y resistencia al ataque de agentes antimicrobianos.
- Persistencia bacteriana: existe la capacidad de cierto número de bacterias del biofilm de resistir el ambiente agresivo, siendo alta la resistencia a agentes antibióticos así como a desinfectantes químicos.

INFLUENCIA DE LOS IRRIGANTES EN LA ADHESIÓN DE LAS BACTERIAS A LA DENTINA

La adherencia de las bacterias a superficies duras o biomateriales es el primer paso en la formación de un biofilm y la posterior infección provocada por éste. *E. faecalis* posee distintos factores de virulencia que le permiten adherirse a la dentina e invadir lo túbulos dentinarios. Los enterococcus expresan factores que ayudan a su adhesión a las células del huésped y a la matriz extracelular, lo que favorece la invasión hística, causando inmunomodulación y provocando daño mediado por toxinas²⁰⁻²¹.

Kishen y cols.,²⁰ estudiaron la influencia de la irrigación en la adherencia y fuerza de la adherencia de *E. faecalis* a la dentina del canal radicular, midiendo la adherencia mediante microscopía fluorescente y la fuerza de adhesión mediante microscopio de fuerza atómica. Observaron que la adherencia bacteriana a la dentina fue muy influenciada por el último irrigante del conducto utilizado. Cuando el ácido etilen-diamino-tetra-

cético (EDTA) fue el último irrigante se obtuvieron unos datos de adherencia mayores que cuando se utiliza otro irrigante en último lugar. Cuando se utilizó hipoclorito sódico (NaOCl) como irrigante final, la adherencia bacteriana se redujo en un 27%. Estos datos se pueden explicar en que cuando es usado el EDTA como último irrigante, se produce una desmineralización de la dentina que expone las fibras colágenas, creando un sustrato ideal para la adhesión de *E. faecalis*. Cuando tras el EDTA fue usado NaOCl, la capa expuesta de fibras colágenas fue retirada, reduciéndose a su vez la adherencia bacteriana.

Sin embargo, los estudios llevados a cabo por Barón y cols.,²¹ exponen que, a mayor rigidez de la dentina, mayor fuerza en la adhesión de *E. faecalis* a las paredes dentinarias en el interior del conducto; el NaOCl, al eliminar el componente orgánico de la dentina, las fibras colágenas expuestas, elimina la parte responsable de otorgar cierta elasticidad a la dentina, provocando mayor rigidez y por tanto mayor en la fuerza de adhesión.

Más estudios han de ser llevados a cabo en este aspecto, pero todos estos datos dejan claro que el protocolo de irrigación es muy importante no sólo para eliminar la carga bacteriana, sino para reducir la adherencia y la fuerza en la adhesión de las bacterias a las paredes dentinarias del *E. faecalis*, principal causante de las periodontitis apicales y de los fracasos endodónticos.

ELIMINACIÓN DE BIOFILMS EN ENDODONCIA: IRRIGANTES

Enterococcus faecalis es el más común y a veces, la única bacteria aislada de los conductos radiculares en periodontitis apicales persistentes. Su inherente resistencia antimicrobiana, su habilidad para adaptarse a los cambios en el entorno y su crecimiento dentro de los conductos radiculares como biofilm, lo hacen responsable de la mayoría de los fracasos endodónticos²²⁻²³.

Arias-Moliz y cols.,²⁴ compararon 0,1% NaOCl, 4% clorhexidina (CHX), 17% EDTA, 25% ácido cítrico y 5% ácido fosfórico, frente a la erradicación del biofilm de *E. faecalis*, evaluando dicha erradicación mediante microscopio electrónico de barrido; comparando según la concentración y el tiempo en contacto, los únicos capaces de erradicar el biofilm de *E. faecalis* fueron el NaOCl a 0,00625% durante un minuto como concentración mínima, mientras que la CHX consiguió erradicar el biofilm a concentraciones mínimas de 1% en 10 minutos y 2% en 5 minutos. Los ácidos quelantes mostraron nula eficacia en su capacidad antimicrobiana contra el biofilm de *E. faecalis*.

Dunavant y cols.,²⁵ compararon la acción de otros irrigantes frente a la erradicación de *E. faecalis*; Los datos del estudio reflejan de nuevo que el NaOCl posee los mejores porcentajes en la eliminación del biofilm, tanto en las concentraciones de 1 y 6 %.

Clegg y cols.,²⁶ usaron NaOCl en concentraciones de 6%, 3% y 1%, así como CHX 2% y Biopure MTAD®. Los datos del

estudio reflejan que el NaOCl al 6% es el único irrigante que consigue romper el biofilm y eliminar todas las bacterias, no existiendo ninguna fase de crecimiento; el NaOCl al 1% no consiguió del todo romper el biofilm, mientras que la CHX al 2% no es capaz de erradicarlo.

Aunque muchos estudios han demostrado la habilidad de varios irrigantes para eliminar las bacterias del interior de los conductos radiculares, es posible que parte de las bacterias queden en los túbulos dentinarios; los componentes bacterianos como los lipopolisacáridos, peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos pueden inducir la liberación de citoquinas mediadoras de la inflamación de los neutrófilos y monocitos-macrófagos. La interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral α una vez liberados provocarán una reacción inflamatoria provocando la destrucción del tejido. Mattison y cols.,²⁷ estudiaron los lipopolisacáridos como causantes de destrucción de hueso en la región periapical cuando son inoculados en conductos radiculares en perros.

Ordinola-Zapata y cols.,²⁸ compararon 1% NaOCl, 17% EDTA, 10% ácido cítrico, 2% CHX y agua destilada (control) en la medición de la reducción del biovolumen, que se define como el volumen ocupado por los microorganismos en las tres dimensiones del espacio. Los datos del estudio revelaron que el NaOCl es el único irrigante de los estudiados capaz de romper y desordenar la estructura interna del biofilm.

Arias-Moliz y cols.,²⁹ realizaron un estudio para comprobar la capacidad de la CHX en evitar la formación de un biofilm, obteniendo unos resultados muy satisfactorios frente a varios tipos de biofilms experimentales; se puede confirmar que la inherente capacidad antimicrobiana de la CHX, dependiendo por supuesto de su concentración, unido a su gran sustantividad, es capaz de inhibir la formación de los biofilms, pero no de erradicarlo per se, salvo contacto por tiempos prolongados.

Ordinola-Zapata y cols.,³⁰ compararon la erradicación y limpieza del biofilm de secciones del conducto radicular en dientes bovinos con NaOCl 6% activado de distintos métodos:

- Grupo control (irrigación con agua destilada)
- Irrigación con aguja convencional a 2 mm de longitud de trabajo (LT)
- Activación por Endoactivator® (activación sónica)
- Activación ultrasónica pasiva (Irri Safe®)
- Activación mediante láser de Erbium:YAG (Er:YAG) (2940 nm de longitud de onda)

Los grupos activados mediante ultrasonidos y láser fueron los que mostraron mejores resultados, eliminando el biofilm de las paredes del conducto casi en su totalidad. A la capacidad del NaOCl al 6% de eliminar el biofilm, sumamos la mejora en la eliminación con la activación de la irrigación según estos métodos. La activación por Endoactivator® y la irrigación con aguja convencional a 2 mm de LT mostraron resultados similares.

En el estudio de Bhuvu y cols.,³¹ el NaOCl al 1% fue capaz de eliminar el biofilm tanto cuando se irrigó con jeringa convencional como cuando se utilizó la activación ultrasónica pasiva.

USO DEL LÁSER EN ELIMINACIÓN DE BIOFILMS

Hoy en día, existen estudios suficientes que confirman que láseres como Neodmio YAG (Nd:YAG), Er:YAG y Holmium YAG (Ho:YAG) pueden ser grandes aliados en la desinfección en terapia endodóntica. El desarrollo de varias longitudes de onda y el uso de parámetros seguros de energía han permitido disminuir los efectos secundarios postoperatorios que provocaban los láseres, una propicia desinfección del conducto y disminuir los cambios estructurales en la dentina provocados por el calor de los mismos. Hoy en día, en endodoncia, se trata de usar energías bajas, con el fin de no dañar el periodonto y así disminuir el dolor postoperatorio. Los efectos biológicos producidos por un láser dependerán de la longitud de onda, frecuencia, duración de la exposición y la densidad de energía; en cuanto al tejido irradiado, dependerá de su absorción, reflexión, transmisión y dispersión³².

Moritz y cols., demostraron disminución de la carga bacteriana de *E. faecalis* y *E. coli* en un 99,64%, 99,16% y 99,05% con láseres de Er:YAG, Nd:YAG y Ho:YAG respectivamente. La eliminación bacteriana de los conductos radiculares aumenta la tasa de éxito de los tratamientos endodónticos³³.

Actualmente se tiende más a la utilización del láser Er:YAG debido a la necesidad de utilizar menor energía consiguiendo los mismos resultados.

Noiri y cols.,³⁴ utilizaron el láser de Er:YAG en la erradicación de biofilms de reconocidas bacterias que provocan patología endodóntica, utilizando una energía entre 20 - 80 mJ (J/cm²). En los valores de 20 mJ la reducción bacteriana fue escasa, pero en 40 y 80 mJ la reducción de *E. faecalis* fue estadísticamente significativa.

Bergmans y cols.,³⁵ comprobaron el efecto antimicrobiano del láser de Nd:YAG sobre bacterias inoculadas (no biofilms) en dientes. De hecho, cuando en este estudio se formaron biofilms de *E. faecalis* la reducción bacteriana se redujo, disminuyendo su efecto antimicrobiano. Se utilizó láser de Nd:YAG con una energía de 100 mJ., proporcionando unos datos de muerte de *E. faecalis* en un 99,7%. Por supuesto, más estudios son necesarios sobre biofilms para comprobar la eficacia del láser, pero este estudio nos deja ver que el de Nd:YAG es un buen suplemento a los protocolos de irrigación para la desinfección de los conductos radiculares en endodoncia.

USO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN LA ELIMINACIÓN DE BIOFILMS

El uso de terapia fotodinámica en la eliminación de biofilms intraradiculares junta dos aspectos de reciente aparición en los estudios en terapia endodóntica; pocos estudios han sido publicados relacionando estos dos aspectos.

La terapia fotodinámica aparece en los años 80 en medicina, como tratamiento para erradicar células premalignas y estados iniciales de cáncer, reduciendo el tamaño de la masa de células tumorales. La palabra fotodinamia puede explicarse como los efectos de la activación de la luz sobre organismos vivos. La terapia fotodinámica es una nueva estrategia en la eliminación de los microorganismos, que se compone de un fotosensibilizador y una fuente de luz; al excitar mediante luz el fotosensibilizador, a una determinada longitud de onda, éste reacciona con las moléculas de oxígeno, provocando la formación de moléculas de oxígeno activadas muy reactivas, que inducen la lesión y muerte bacteriana, provocando daños sobre moléculas celulares como proteínas, membranas lipídicas y ácidos nucleicos.

Vaziri y cols.,³⁶ estudiaron el efecto de la terapia fotodinámica y la terapia fotodinámica combinada con la irrigación con 2,5% de NaOCl sobre la eliminación de *E. faecalis* como bacteria planctónica, no como formadora de biofilm. Los datos que arroja el estudio es una eliminación completa de la bacteria cuando se utilizan juntos NaOCl 2,5% + terapia fotodinámica, siendo incapaz de eliminar la bacteria por completo la terapia fotodinámica utilizada solamente.

Garcez y cols.,³⁷ sobre el efecto de la terapia fotodinámica en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* y *Photorhabdus luminescens*, confirmaron una mayor reducción de la carga bacteriana del biofilm cuando se utiliza juntos con las técnicas convencionales de desinfección de conductos ($P < 0.05$), impidiendo a su vez el crecimiento de los microorganismos tras 24 h del tratamiento ($P < 0.0001$).

MEDICACIÓN INTRACONDUCTO CONTRA BIOFILM

El uso de medicación intraconducto en endodoncia ha sido estudiado y utilizado con el fin de reducir la carga bacteriana de los conductos entre sesiones en procesos necróticos, así como en tratamientos de apicoformación para inducir el cierre apical y en procesos de revascularización en dientes inmaduros con ápices abiertos. En la valoración de medicación intraconducto contra biofilms, existen reducidos estudios.

Ordinola-Zapata y cols.,³⁸ compararon hidróxido de calcio, gel de CHX 2% y pasta triantibiótica como medicación intraconducto en la eliminación del biofilm intrarradicular dejando actuar cada sustancia siete días. Ninguno de los medicamentos mostró una eliminación completa del biofilm.

Saber y cols.,³⁹ compararon la susceptibilidad del biofilm de *E. faecalis* a algunas sustancias utilizadas como medicación intraconducto: fueron utilizados: amoxicilina + ácido clavulánico, ciprofloxacino, clindamicina, doxiciclina e hidróxido de calcio. Ninguna sustancia fue capaz de eliminar por completo el biofilm de *E. faecalis*; los peores datos fueron los del grupo del hidróxido de calcio, con un 0% de bacterias del biofilm eliminadas (0% colonias eliminadas). El hidróxido de calcio vuelve a obtener los peores resultados; como se dijo con anterioridad, esto puede ser explicado debido a la necesidad de desorganización previa del biofilm por acción del NaOCl.

CONCLUSIÓN

Esta revisión bibliográfica nos ayuda a comprender cómo debemos centrarnos en la eliminación de los biofilms y no de bacterias aisladas; los estudios hasta hace poco tiempo se centraron en la eliminación de bacterias y no de conjuntos bacterianos de biopelículas.

El *E. faecalis* es la bacteria principalmente relacionada con el fracaso endodóntico, poseyendo muchos factores de virulencia y una resistencia mediada por la formación de biofilms. Una adecuada irrigación con NaOCl y el uso de quelantes del calcio como EDTA mejorará sobremanera la erradicación bacteriana dentro de los conductos. La activación de la irrigación mejora la desinfección, y el uso de técnicas nuevas como el láser y la terapia fotodinámica nos acercarán a la máxima desinfección.

El estudio de los biofilms en endodoncia es un tema relativamente nuevo, donde se basarán futuros estudios destinados a comprobar cuál es la mejor manera de conseguir la erradicación de los mismos.



BIBLIOGRAFÍA

1. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 881-890.
2. Monds RD, O'Toole GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* 2009; 17: 73-87.
3. Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005; 115: 578-582.
4. Ramadan HH, Sanclement JA, Thomas JG. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132: 414-417.
5. Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006; 116: 1121-1126.
6. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 2000; 146 (10): 2395-2407.
7. Dalton HM, Goodman AE, Marshall KC. Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1996; 17: 228-234.
8. Tolker-Nielsen T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobsen CS, Molin S. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. *J Bacteriol* 2000; 182: 6482-6489.
9. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
10. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marré TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 435-464.
11. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilm. *J Bacteriol* 1991; 173: 6558-6567.
12. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
13. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176: 2137-2142.
14. Dunne WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2000; 15: 155-166.
15. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-138.
16. Anderl JN, Franklin M J, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1818-1824.
17. De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4339-4344.
18. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2125-2133.
19. Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 22-30.
20. Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod* 2008; 34 (7): 850-4
21. Barón M, Llana C, Forner L, Palomares M, González-García C, Salmerón-Sánchez M. Nanostructural changes in dentine caused by endodontic irrigants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18(4): 733-766.
22. Stuart CH, Shwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32 (2): 93-98.
23. Carr GB, Schwartz RS, Schaudinn C, Gorur A, Costerton JW. Ultrastructural Examination of Failed Molar Retreatment with Secondary Apical Periodontitis: an Examination of Endodontic Biofilms in an Endodontic Retreatment Failure. *J Endod* 2009; 35 (9): 1303-1309.
24. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod* 2009; 35 (5): 711-714.
25. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006; 32 (6): 527-531.
26. 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; 32 (5): 434-437.
27. Mattison GD, Haddix J, Kehoe JC. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. *J Endod* 1987; 13: 559-65.
28. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomez de Moraes I, Marciano M, Duarte MAH. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012; 45: 162-168.
29. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Navarro-Escobar E, Furtado-Antunes de Freitas M, Baca P. Antimicrobial activity and *Enterococcus faecalis* biofilm formation on chlorhexidine varnishes. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17 (4): 705-709.
30. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Aprecio RM, Handysides R, Jaramillo DE. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *Int Endod J* 2013; 47 (7): 659-666.
31. Bhuvu B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J* 2010; 43: 241-250.
32. De Paula-Eduardo C, Gouw-Soares S. The Use of lasers for endodontic applications in dentistry. *Med Laser Appl* 2001; 16: 231-243.
33. Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Jakolitsch S, Kluger W, Wernisch J, Sperr W. The bactericidal effect of Nd:YAG, Ho:YAG, and Er:YAG laser irradiation in the root canal: an in vitro comparison. *J Clin Laser Med Surg* 1999; 17: 161-164.
34. Noiri Y, Katsumoto T, Azakami H, Ebisu S. Effects of Er:YAG laser irradiation on biofilm-forming bacteria associated with endodontic pathogens in vitro. *J Endod* 2008; 34 (7): 826-829.
35. Bergmans L, Moisiadis P, Teughels W, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 2006; 39: 547-557.
36. Vaziri S, Kangarlou A, Shahbazi R, Nazari Nasab A, Naseri M. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an in vitro study. *Dent Res J* 2012; 9(5): 613-618.
37. Garcez AS, Ribeiro M, Tegos GP, Núñez S, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 59-66.
38. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Gagliardi Minotti P, Cavallini Cavenago B, Brandao Garcia R, Bernardini N, Jaramillo DE, Hungaro Duarte MA. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral - infected dentin biofilm model. *J Endod* 2013; 39 (1): 115-8.
39. Saber SM, El Hady SA. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *Eur J Dent* 2012; 6: 43 - 50.