



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
ÁREA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA
ÁREA ENDODONCIA
DEPARTAMENTO DE PRÓTESIS
ÁREA DE PRÓTESIS FIJA

Análisis microscópico y químico de la interacción entre Hipoclorito de Sodio 5% y Clorhexidina 2% sobre las paredes del canal radicular al utilizar distintos irrigantes intermedios. Estudio *ex vivo*

Diego Andrés Cruz Lathrop

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Ismael Yévenes López

Dr. Mauricio Ruiz Nolf

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
ÁREA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA
ÁREA ENDODONCIA
DEPARTAMENTO DE PRÓTESIS
ÁREA DE PRÓTESIS FIJA

Análisis microscópico y químico de la interacción entre Hipoclorito de Sodio 5% y Clorhexidina 2% sobre las paredes del canal radicular al utilizar distintos irrigantes intermedios. Estudio *ex vivo*

Diego Andrés Cruz Lathrop

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Ismael Yévenes López

Dr. Mauricio Ruiz Nolf

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2018

***“A mi madre, Verónica Lathrop Donoso
y a mis hermanos Cristóbal y Rocío.***

La familia está en todo”

AGRADECIMIENTOS

Creo que he pensado en este momento tantas veces durante el transcurso de esta experiencia, que ahora que debo plasmar en algunas palabras lo que siento, resulta difícil.

Primero que todo le agradezco a mi madre, Verónica, por haberme entregado los valores y la dedicación para esforzarme siempre por lo que deseaba conseguir, por enseñarme con su ejemplo que sin importar las dificultades que se presenten, con esfuerzo y determinación todo se puede lograr y mucho más. Que nunca ha bastado con lo mínimo, sino que siempre hay que ir más allá. Gracias por el amor que sólo en ti sé, nunca se acabará.

A mis hermanos Cristóbal y Rocío, por su ejemplo, por las peleas, por siempre querer que sea una mejor persona, pero sobre todo, por el cariño que siempre estuvo presente, aún en los momentos más difíciles, su apoyo es de las pocas cosas que puedo saber que siempre perdurará.

Quiero agradecer especialmente a las amistades que formé durante esta etapa, a mi Lumpen, mis amigas incondicionales, nunca creí poder encontrar personas tan bonitas en la aventura de la universidad. Gracias por compartir los llantos, los momentos de estrés, las alegrías, las celebraciones de cada pequeño triunfo y los momentos de delirio tanto fuera como dentro de la universidad. Este logro también es suyo. Que el botón de emergencia nunca se desconecte.

A mis negros, por compartir conmigo en tantos momentos y ser un apoyo siempre. Por esas conversaciones y celebraciones distorsionadas tan necesarias a veces, por las risas y buenos momentos que espero no se esfumen en el futuro.

A Clau, la mejor compañera de clínica que pude haber tenido, una gran amiga, gracias por ayudarme siempre que te necesité, por entenderme, gracias porque sólo contigo pude encontrar el orden en los momentos más caóticos, por los consejos y tu amistad.

A mi otra familia elegida, mis amigos de siempre y para siempre, Víctor, Boris, Janis y Eileen. Gracias por siempre estar para mí, y por compartir la tan real y disparatada versión de nuestras vidas. Por las noches en vela desahogándonos, por el apoyo

eterno, por todas las canciones, el crecer juntos, por las risas descontroladas y los desayunos familiares después de carretear. Gracias por permanecer a mi lado siempre.

A Cami, en especial durante este proceso de escribir la tesis, por trabajar a mi lado siempre con una sonrisa. Gracias por compartir el estrés y la ansiedad conmigo, con tu apoyo fue una experiencia llevadera, que pude disfrutar y de la que no podría estar más contento de haber realizado junto a ti.

Un agradecimiento especial a Nicole y Fran, por acogerme en sus vidas y convertirse en una nueva familia para mí. Gracias Casona, por estar ahí, por tomar once juntos al final del día, por desahogarnos y reírnos juntos, por apoyarnos y escucharnos, por ver series hasta la madrugada y soportar mi ruidosa presencia jajaja. Gracias por volverse una parte muy bonita de mi vida.

A mis tutores Dra. Alejandra Fuenzalida, Dr. Mauricio Ruíz, Prof. Ismael Yévenes, por su guía y paciencia en este proceso. Gracias por estar siempre presentes durante este desafío, que no hubiera sido el mismo sin su apoyo, sin su disposición a estar ahí, para superar los obstáculos y avanzar siempre. Gracias por ser fundamentales en esta etapa de mi formación, por los consejos y por la entrega.

Profe Fuenzalida, quiero agradecer especialmente su cariño, en usted más que un docente conocí a una maestra, gracias por las conversaciones de vida, por ser siempre rigurosa para avanzar, por todas las enseñanzas personales y profesionales, esta etapa no hubiera sido lo mismo sin su apoyo, gracias por estar y ser parte.

Profe Ruiz, gracias por ser un ejemplo de entrega y dedicación a lo que uno hace, por ser estricto con hacer las cosas bien. Le agradezco especialmente haber tenido fe en mi en los momentos que hasta yo dudé, sin dudas estoy aquí ahora gracias a su confianza y guía incondicional. Un verdadero maestro.

Quizás hay muchos más a quien agradecer, de verdad sólo decir que me siento afortunado de haber conocido y compartido con todos los que fueron parte de estos años de universidad, muchas gracias, sin dudas fue una experiencia vivida a concho.

Gracias.

ÍNDICE

Contenido

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Marco Teórico.....	5
3.1 Soluciones Irrigantes.....	5
3.1.1 Hipoclorito de Sodio (NaClO).....	6
3.1.2 Ácido etildiaminotetraacético (EDTA).....	10
3.1.3 Clorhexidina (CHX).....	11
3.2 Interacción entre irrigantes.....	13
3.2.1 Asociación entre NaClO y CHX.....	16
3.3 Permeabilidad dentinaria y paracloroanilina (PCA).....	18
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivos generales.....	20
6. Objetivos específicos.....	20
7. Materiales y métodos.....	21
7.1 Tipo de estudio.....	21
7.2 Materiales.....	21
7.3 Selección de la muestra.....	23
7.4 Procedimientos clínicos.....	25
7.4.1 Recolección de las muestras.....	25
7.4.2 Tratamiento endodóntico y obtención de las muestras.....	25
7.5 Procedimientos de laboratorio.....	28
7.5.1 Determinación de la concentración de NaClO.....	28
7.5.2 Determinación de la concentración de PCA.....	30
7.6 Análisis estadístico de las concentraciones.....	32
7.7 Determinación del grado de obliteración de los túbulos dentinarios.....	33
7.7.1 Corte dentario.....	33

7.7.2 Preparación de muestras para visualización en microscopio electrónico de barrido (MEB).....	34
7.7.3 Selección de áreas de análisis y recuento tubular.....	35
7.8 Análisis estadístico del grado de obliteración de los túbulos dentinarios.....	38
8. Resultados.....	38
8.1 Concentración de NaClO.....	38
8.2 Concentración de PCA.....	42
8.3 Grado de obliteración de túbulos dentinarios.....	45
9. Discusión.....	49
10. Conclusiones.....	56
11. Referencias Bibliográficas.....	57
12. Anexos.....	64
1. Protocolo de irrigación.....	64
2. Formulario de consentimiento informado.....	67
3. Dispositivo para recolección de muestras.....	69
4. Protocolo de corte dentario para microscopía.....	70
5. Protocolo de preparación de muestras para visualización en microscopia electrónica de barrido.....	71
6. Protocolo para selección de áreas de análisis y recuento tubular.....	72

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviación	Significado
AC	Ácido Cítrico
CHX	Clorhexidina
Ca(OH)₂	Hidróxido de Calcio
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
IRR	Irrigación
IRRI	Irrigación intermedia
MEB	Microscopía electrónica de barrido
NaCl 0,9%	Suero Fisiológico
NaClO	Hipoclorito de Sodio
PCA	Paracloroanilina
PQM	Preparación Químio-Mecánica
SCR	Sistema de canales radiculares

1. RESUMEN

Introducción: En la terapia endodóntica, el protocolo de irrigación y medicación se basa en la combinación de distintos agentes químicos en una secuencia específica. Esto genera la posibilidad de interacción entre soluciones que conlleva a la formación de diversos subproductos. Al utilizar hipoclorito de sodio (NaClO) y clorhexidina (CHX), se genera un precipitado tóxico denominado paracloroanilina (PCA), que puede obliterar los túbulos dentinarios al interior del canal radicular, afectando el efecto de la medicación intracanal y el correcto sellado endodóntico. El objetivo de este estudio es determinar *ex vivo* cómo varía la cantidad de PCA y el grado de obliteración de los túbulos dentinarios de las paredes del canal radicular utilizando diferentes irrigantes intermedios entre NaClO y la medicación con CHX 2%.

Materiales y Método: Se seleccionaron 30 dientes humanos unirradiculares, a los que se les realizó la preparación quimiomecánica (PQM) utilizando el protocolo de irrigación y medicación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. El grupo control (10 dientes) utilizó suero fisiológico como irrigante intermedio y los grupos experimentales (10 dientes cada grupo), agua destilada y alcohol 70%. Se recolectaron 12 volúmenes en cada grupo de acuerdo a las diferentes etapas del protocolo endodóntico y se determinaron concentraciones de NaClO y PCA mediante la técnica de espectrofotometría. Posteriormente, los dientes fueron seccionados y preparados para su visualización mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Se determinó el grado de obliteración de los túbulos dentinarios mediante el análisis de las imágenes obtenidas.

Resultados: Se observó formación de PCA en los tres grupos de estudio, presentando una concentración menor y estadísticamente significativa en el grupo en que se utilizó agua destilada en comparación con el grupo control. Al comparar el grado de obliteración tubular, el grupo en que se utilizó agua destilada presentó mejores resultados, seguido del alcohol 70% y finalmente suero fisiológico.

Conclusión: Se forma PCA al medicar con CHX 2% en los tres grupos estudiados sin diferencias significativas entre ellos, aunque al utilizar agua destilada se obtienen menores concentraciones en relación al grupo control. El grado de obliteración de los túbulos dentinarios es menor cuando se utiliza agua destilada como irrigante intermedio entre NaClO y la medicación con CHX 2%.

2. INTRODUCCIÓN

En términos generales, el éxito del tratamiento endodóntico tiene un carácter multifactorial, donde se deben considerar diversos aspectos: las defensas del hospedero, los microorganismos presentes y su nivel de organización y las consideraciones técnicas propias del procedimiento terapéutico. Se han descrito múltiples indicadores de éxito como por ejemplo signos radiográficos que muestren una disminución del tamaño de lesiones periapicales preexistentes y la ausencia de sintomatología clínica del diente tratado al realizar un seguimiento de 1 año. Para conseguir este objetivo se hace necesario eliminar o reducir en el mayor porcentaje posible los microorganismos y el tejido pulpar inflamado o necrótico presente en el sistema de canales radiculares (SCR), el que debido a su complejidad anatómica (presencia de istmos, tabicaciones y/o ramificaciones) requiere del uso de diversos recursos terapéuticos para su abordaje y la instrumentación mecánica por sí sola es insuficiente, por lo que resulta fundamental el uso de sustancias irrigantes coadyuvantes a la instrumentación para lograr la limpieza y desinfección de los canales radiculares (Zehnder y cols. 2006).

Los instrumentos endodónticos tanto manuales o rotatorios abordan sólo parcialmente el SCR dejando regiones inaccesibles en donde se pueden establecer conglomerados bacterianos en forma de complejos biofilms difíciles de disgregar. Esto se suma a que durante preparación mecánica del canal radicular se genera una capa de barro dentinario que dificulta aún más la desinfección de las paredes de éste y que también interfiere con una óptima adaptación y sellado del material obturador. Una irrigación eficiente puede llevar soluciones antimicrobianas a esas

áreas de difícil acceso removiendo el biofilm y barro dentinario e incluso tener la capacidad de penetrar en los túbulos dentinarios de las paredes del canal radicular (Darcey y cols, 2016).

Al analizar la ultraestructura de las paredes del SCR es importante tener en consideración que los irrigantes utilizados en endodoncia deben tener como una de sus propiedades fundamentales, la capacidad de eliminar tejido orgánico, restos de sedimentos, precipitados y el barro dentinario generado durante la instrumentación. Así se favorece una óptima desinfección del canal, la acción de la medicación tópica y la adaptación del material obturador para conseguir un sellado hermético y tridimensional (Jimenez-chavez y cols, 2013, Estrela y cols., 2005 y Hülsmann y cols. 2003).

Al hacer referencia de los irrigantes utilizados en endodoncia se debe mencionar que estos presentan objetivos mecánicos, químicos y biológicos. Los mecánicos y químicos son: **(1)** eliminar detritus, **(2)** lubricar el canal, **(3)** disolver tejido orgánico e inorgánico y **(4)** prevenir la formación del barro dentinario durante la instrumentación o disolverlo una vez que se ha formado. Por otra parte, los objetivos biológicos de los irrigantes están directamente relacionados con su función antimicrobiana y son principalmente: **(1)** la eliminación de microorganismos anaeróbicos y facultativos en su estado planctónico y en biofilm, **(2)** la inactivación de endotoxinas y **(3)** el no causar daños a los tejidos periapicales o reacciones anafilácticas en el individuo. (Basrani y Haapasalo, 2012).

Basarani y Haapasalo (2012) tomando en cuenta los requisitos de los irrigantes establecieron una serie de características que debiera tener un irrigante endodóntico. Estas características se exponen en la **Tabla N°1**.

Ahora bien, se ha descrito que actualmente no existe una solución irrigante que por sí sola cumpla con todos los objetivos de la irrigación, por lo que se deben combinar dos o más sustancias en una secuencia específica para conseguirlos pero con la posibilidad de que al combinar dichos agentes químicos se generan interacciones potencialmente dañinas para el hospedero o indeseables para el desarrollo del tratamiento endodóntico (Haapasalo, 2010 y 2012).

Tabla N°1. Características del irrigante ideal (Basrani y Haapasalo, 2012)	
1.	Efectivo germicida y fungicida.
2.	No irritante para los tejidos periapicales.
3.	Estable en solución.
4.	Efecto antimicrobiano prolongado y sostenido después de su uso.
5.	Activo en la presencia de sangre, suero, y proteínas derivadas de los tejidos.
6.	Capaz de eliminar completamente el barro dentinario.
7.	Baja tensión superficial.
8.	Capaz de desinfectar la dentina / túbulos dentinarios.
9.	No interfiere con la reparación de los tejidos periapicales.
10.	No pigmenta la estructura dentaria.
11.	Puede inactivarse en medios de cultivo
12.	No induce una respuesta inmune mediada por células. Es no antigénico, no tóxico y no carcinógeno para las células del tejido que rodea al diente.
13.	No tiene efectos adversos sobre las propiedades físicas de la dentina.
14.	No tiene efectos adversos en la capacidad de sellado de los materiales.
15.	Fácil de usar / aplicar.
16.	Bajo costo.

Debido a lo anteriormente expuesto y al desafío que significa utilizar una combinación de irrigantes y medicamentos que no genere subproductos nocivos para el hospedero o que alteren los resultados del tratamiento, este estudio tendrá como objetivo determinar el efecto de distintos irrigantes intermedios al ser utilizados entre NaClO 5% y la medicación intracanal con CHX 2%. Específicamente, buscará analizar la formación de PCA a nivel químico y mediante la visualización por microscopía electrónica de barrido (SEM) y describir cómo la presencia de estas reacciones altera la permeabilidad de los túbulos dentinarios al interior del canal radicular.

3. MARCO TEÓRICO

Durante el tratamiento endodóntico, restos de tejido pulpar vital o necrótico, pueden servir de sustrato para la nutrición de la microbiota asociada a la patología endodóntica debido a la compleja anatomía del SCR. Algunos autores han descrito que cerca del 50% de la superficie a tratar durante la terapia permanece no instrumentada, lo que se traduce en un desbridamiento insuficiente que puede comprometer el resultado final del tratamiento (Naenni y cols. 2004, Peters y cols, 2001). Es por esto, que conjuntamente a la preparación mecánica del canal, ha sido necesaria la incorporación de diversos agentes químicos que contribuyan a la correcta eliminación de residuos orgánicos y a preparar las paredes de éste. Esto facilita la integración óptima del material obturador favoreciendo el sellado tridimensional y el consecuente éxito clínico (Gatewood, 2007).

Adicionalmente al uso de irrigantes es necesario utilizar en muchos casos, medicación intracanal posterior a la preparación quimio-mecánica de los canales radiculares para optimizar el control de la infección endodóntica (Siqueira y cols, 2000). Por lo tanto, es fundamental conocer los distintos agentes químicos que se utilizan en forma de irrigantes o como medicación intracanal durante el tratamiento endodóntico para entender las posibles interacciones que pudieran producirse entre ellos (Haapasalo y cols., 2010).

3.1 Soluciones irrigantes

En la terapia endodóntica suelen utilizarse diversas sustancias químicas como irrigantes y agentes antibacterianos, tales como el hipoclorito de sodio (NaClO), clorhexidina (CHX), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico (AC), hidróxido de calcio, soluciones de ácido fosfórico (AF), entre otros. A continuación, se describirán las principales características de los irrigantes más utilizados en la actualidad.

3.1.1 Hipoclorito de Sodio (NaClO)

El hipoclorito de sodio (NaClO) es el compuesto más utilizado a nivel mundial en endodoncia para la irrigación de los canales radiculares, desde principios del Siglo XX (Serper y cols., 2004). Su principal característica es la capacidad de disolver restos de tejido pulpar, tanto vital como necrótico, además de tratarse de un potente agente antibacteriano con alto poder citotóxico (Mhera y cols., 2000).

El efecto del NaClO sobre los tejidos orgánicos y la función biológica que éste posee se debe a que al interaccionar con agua y estando en contacto con estos tejidos, se genera una reacción de balance dinámico donde se forma ácido hipocloroso (HClO), como se muestra en la **Figura N°1**. (Estrela y cols., 2002).

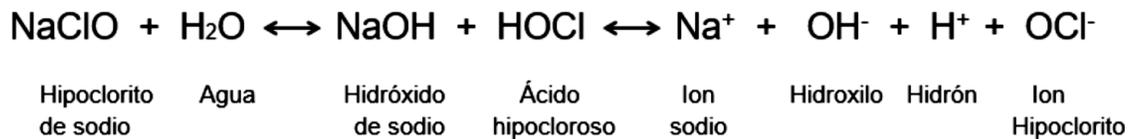


Figura N°1: Balance dinámico del hipoclorito de sodio (Pécora y cols. 1999)

A nivel químico se ha descrito que el mecanismo de acción del NaClO en contacto con tejido orgánico se puede explicar mediante 3 reacciones fundamentales: **(1)** Saponificación, **(2)** Neutralización y **(3)** Cloraminación.

La saponificación, como se muestra en la **Figura N°2**, es una reacción donde el NaClO funciona como solvente orgánico, actuando sobre los tejidos y ácidos grasos, produciendo como producto glicerol (alcohol) y sales de ácidos grasos (jabón), lo que a su vez, produce una reducción en la tensión superficial del remanente (Estrela y cols., 2002).

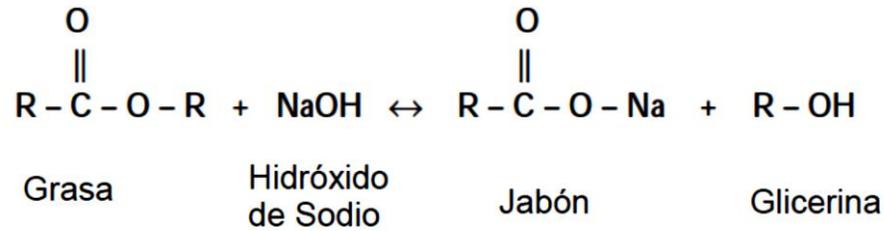


Figura N°2: Reacción de saponificación

Por otra parte, la neutralización se genera debido a que en el equilibrio dinámico del NaClO, el hidróxido de sodio (NaOH) interacciona con el grupo carboxilo de aminoácidos formando como producto agua y una sal, como se observa en la **Figura N°3**.

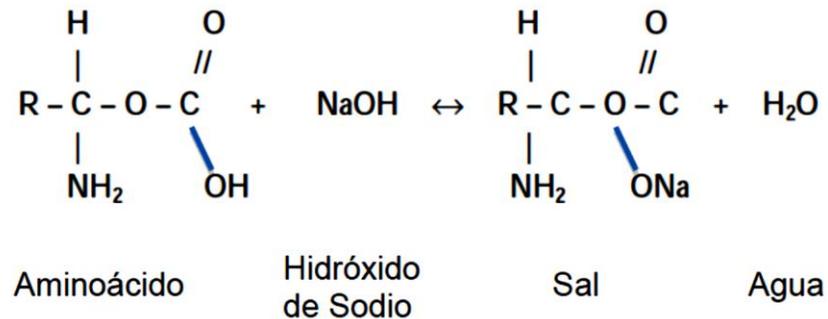


Figura N°3: Reacción de neutralización

Finalmente, y quizás la reacción más importante en términos endodónticos debido a su directa actividad sobre el tejido orgánico, es la **cloraminación**. Esta reacción se potencia cuando se han consumido los iones hidroxilos y permanece el ácido hipocloroso formado por el NaClO en solución, ocurre una reducción de pH, el HClO actúa como solvente orgánico, fenómeno donde se libera cloro que interacciona con los grupos amino (NH₂) de las proteínas, formando cloraminas, las que a su vez, interfieren con el metabolismo celular. **Figura N°4**

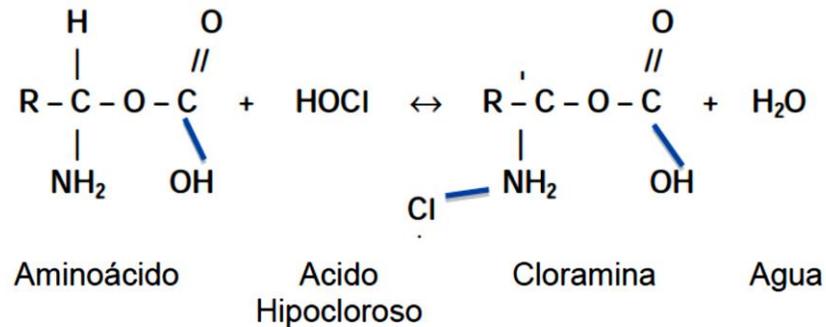


Figura N°4: Reacción de cloraminación

Adicionalmente, el cloro elemental presenta una acción antimicrobiana mediante la inhibición de enzimas bacterianas esenciales a través de la oxidación irreversible de grupos sulfhidrilos (SH) (Estrela y cols., 2002).

Existe controversia respecto a las concentraciones en que se debe administrar el NaClO al ser utilizado como irrigante en endodoncia, donde se describen concentraciones entre 0,5% a 6%. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que el NaClO en altas concentraciones es más efectivo contra diversas cepas bacterianas y levaduras tales como ***Enterococcus faecalis*** y ***Candida albicans*** (Gomes y cols., 2001; Radcliffe y cols., 2004; Ma y cols., 2011). Según Berber y cols. (2006), luego de realizar un estudio *ex vivo* y comparar diferentes concentraciones de NaClO como irrigante durante la aplicación de distintas técnicas de preparación mecánica del canal dentinario, concluyeron que mientras mayor sea la concentración de NaClO, específicamente de un 5,25%, se logra una mejor actividad antibacteriana, logrando además una mayor penetración y desinfección de los túbulos dentinarios.

En contraste, diversos estudios clínicos han propuesto que, tanto altas como bajas concentraciones de NaClO, tienen similar eficacia en la reducción de las bacterias al interior del SCR (Basrani y Haapasalo, 2012). Sin embargo, aunque algunos autores mencionen la gran capacidad del NaClO de eliminar microorganismos aún a bajas concentraciones, incluso 0,1%, se debe contemplar que al analizar su actividad *in vivo*, hay que considerar como factor atenuante la presencia del material orgánico como el exudado inflamatorio, remanentes de tejido

pulpar vital o necrótico y residuos bacterianos, que interaccionan y consumen parte de éste, disminuyendo así su efecto (Haapasalo y cols., 2010).

Se ha descrito también, que el NaClO en altas concentraciones tiene una mejor capacidad de disolución de los tejidos, aumentando la eliminación de células bacterianas y logrando una mayor capacidad de penetración en dentina, más aún si se incrementa el tiempo de exposición (Ma y cols., 2011). En bajas concentraciones, pero utilizado en grandes volúmenes puede ser igualmente efectivo. En este caso se recomienda que la solución se utilice en mayor volumen y en intervalos más frecuentes para compensar las limitaciones relacionadas a una menor concentración de NaClO (Siqueira y cols., 2000).

Aunque la irrigación continua y el tiempo de exposición son fundamentales para facilitar la acción de NaClO, se ha descrito que adicionalmente a la concentración (Haapasalo y cols., 2000), la temperatura y grado de agitación, son elementos que incrementan los efectos del irrigante sobre el tejido orgánico (Stojicic y cols., 2010).

Dentro de las desventajas del NaClO se incluyen principalmente su sabor desagradable, toxicidad y la capacidad de provocar irritación de las mucosas o de los tejidos periapicales en caso de proyección de este irrigante a través del foramen apical hacia el área circundante (Haapasalo y cols., 2010).

El NaClO es el único irrigante usado en endodoncia que disuelve tejidos orgánicos vitales y necróticos, pero es incapaz de eliminar la parte inorgánica del barro dentinario generado durante la preparación quimiomecánica del SCR, por lo que la eliminación completa de éste se logra utilizando un agente quelante que actúe sobre el componente mineral residual. Entre los quelantes más utilizados están el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido cítrico (AC), usados como irrigación final previo a la medicación o la obturación del canal radicular ya preparado (Zehnder y cols. 2006)

3.1.2 Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

El EDTA es un ácido poliamino carboxílico que se caracteriza por ser un compuesto cristalino, inodoro, incoloro y soluble en agua cuya fórmula química es $C_{10}H_{16}N_2O_8$ (**Figura N°5**). Se ha descrito como un elemento de toxicidad relativamente baja y sólo levemente irritante por lo que se considera seguro para diversas aplicaciones químicas y biomédicas debido a su habilidad para asociarse a iones metálicos di- y tri-catiónicos como calcio (Ca^{+2}) y hierro (Fe^{+3}) y formar complejos no iónicos solubles en agua, conocidos como quelatos (Seidberg y cols., 1974, Basrani y cols., 2012).

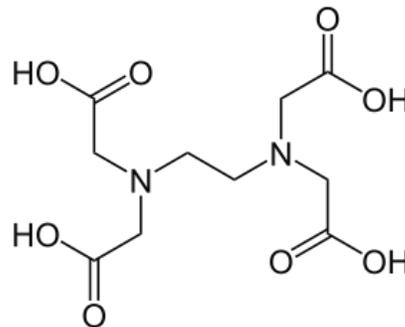


Figura N°5: Ácido Etilendiaminotetraacético o EDTA

Debido a su ya mencionada acción quelante, este compuesto se sugiere como una solución irrigante de gran utilidad en endodoncia, ya que presenta la capacidad de remover la porción inorgánica del barro dentinario. El EDTA reacciona con los iones de calcio presentes en los cristales de hidroxiapatita, por lo que consecuentemente interacciona eliminando el componente mineral de la dentina y de la limalla generada durante la preparación mecánica del canal. La acción quelante de este irrigante está directamente relacionada con diversos factores como la longitud del canal, la profundidad de penetración del irrigante, la dureza de la dentina, el tiempo de aplicación, el pH y la concentración en que se utilice (Sen y cols., 1995).

Según Calt y Serper (2002), al utilizar EDTA al 17% por 1 minuto, seguido de la irrigación con NaClO del 5%, se logra la eliminación de casi la totalidad del barro

dentinario. Sin embargo, cabe señalar que en dicho estudio al usar concentraciones similares, pero en periodos de exposición más prolongados, se observó la erosión de la dentina intertubular y peritubular de las paredes, con el concomitante deterioro de la superficie canalicular. No obstante, Sen BH y cols. (2009) describen que el barro dentinario puede ser igualmente removido al aplicar concentraciones menores del 15%, 10% e incluso 1%, al asociarse con NaClO.

El EDTA se utiliza habitualmente a concentraciones entre el 10% y el 17%, siendo capaz de eliminar el barro dentinario en menos de 1 minuto si la solución alcanza la superficie de la pared del canal radicular adecuadamente. Según Crumpton y cols. (2005), el volumen de irrigación no influye en la calidad de remoción del barro dentinario ya que de acuerdo a los resultados de su estudio, 1 ml de EDTA al 17% en contacto durante 1 minuto con la pared del canal radicular, fue tan efectivo como 10 ml del mismo.

3.1.3 Clorhexidina (CHX)

La CHX es un agente antimicrobiano de amplio espectro, activo contra las bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras. Consiste en una bisguanida catiónica sintética que presenta dos anillos simétricos 4-clorofenil y dos grupos biguanidos conectados por una cadena central hexametilena como se aprecia en la **Figura N°6**. Es una molécula fuertemente básica, estable en forma de sal y soluble en agua (Greenstein y cols., 1986 y Denton, 1991).

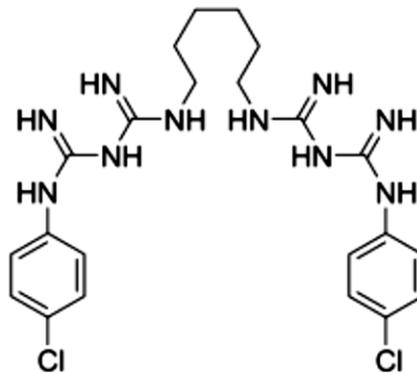


Figura N°6: Estructura molecular, Digluconato de Clorhexidina

La CHX se presenta generalmente como una sustancia incolora y prácticamente inodora y generalmente de sabor amargo. Comúnmente se describe como una base fuerte y estable al presentarse en forma de sal, la que se utiliza mayoritariamente como digluconato de clorhexidina, compuesto soluble en agua que a pH fisiológico se disocia rápidamente (Gomes y cols., 2013). Debido a su naturaleza catiónica, la CHX es capaz de unirse electrostáticamente a las superficies de carga negativa de las bacterias dañando las capas externas de la pared celular y provocando una alteración en el equilibrio osmótico celular debido a que el daño en las capas más externas de la célula induce un aumento en la permeabilidad celular (Davis y cols. 1973).

Dependiendo de su concentración, puede tener efecto bactericida o bacteriostático. A altas concentraciones, la CHX actúa como un detergente y al dañar la membrana celular causa la precipitación del citoplasma y, por lo tanto, ejerce un efecto bactericida. Por otra parte, en bajas concentraciones, la CHX es bacteriostática, causando que sustancias de bajo peso molecular como el potasio y el fósforo, salgan de la célula sin que ésta se vea dañada de forma irreversible (Basrani y cols. 2005).

Debido a la naturaleza catiónica de la CHX se ha señalado su capacidad para unirse a diversos sustratos aniónicos de la cavidad oral, incluso pudiendo ser absorbida por la hidroxiapatita y tejido dentario. Dicha reacción tiene un carácter reversible, lo que se traduce en una absorción y liberación constante que permite a la CHX expresar una actividad antimicrobiana residual que se conoce como "sustantividad", característica fundamental que depende de su concentración y que le permite actuar por un periodo prolongado. Se ha descrito que la CHX se mantendría en la dentina del SCR por aproximadamente 12 semanas, llegando a concentraciones mínimas de 0,001% (Rosenthal y cols., 2004 y Mohammadi y Abbott, 2009).

La CHX se utiliza en endodoncia como irrigante o medicación intracanal en concentraciones del 2% ya que a esta concentración se consigue el efecto bactericida que se requiere dentro del SCR. Estudios *in vitro* han demostrado que en concentraciones entre 0,1% y 0,2% sólo alcanza propiedades bacteriostáticas,

incompatibles con los requerimientos del tratamiento endodóntico (Basrani y cols., 2003, Darcey y cols. 2016).

A pesar del amplio espectro de acción de la CHX sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (principalmente Gram positivas), su incapacidad de disolver tejidos orgánicos limita su uso sólo como un agente coadyuvante durante el tratamiento endodóntico, tal como sugiere el protocolo propuesto por Zehnder y cols. (2006) el que consiste en irrigar con NaClO durante la instrumentación para disolver el componente orgánico, luego irrigar con EDTA para eliminar el componente inorgánico del barro dentinario y por último una irrigación con CHX debido a su sustentividad.

La CHX también puede ser utilizada como medicación intracanal por periodos cortos en dientes con preparación quimiomecánica incompleta o en biopulpectomías por ejemplo, en las que por razones de tiempo no se haya alcanzado a realizar la obturación de los canales radiculares (Gomes y cols. 2013). En estos casos, el uso de CHX 2% como medicación intracanal limita la proliferación bacteriana en el SCR luego de la PQM y genera también una barrera mecánica al interior del canal que evita o dificulta la recolonización (Paquette y cols., 2007 y Mohammadi y cols., 2009)

3.2 Interacción entre irrigantes

Como ya se ha mencionado, no existe ninguna solución que cumpla con las características del “irrigante ideal”, (descritas en la Tabla N°1) por lo que se deben combinar distintas sustancias en una secuencia específica en forma concomitante a la preparación mecánica del SCR.

Durante el tratamiento endodóntico, al emplear distintos agentes químicos en conjunto con la instrumentación mecánica, se genera una interrelación de estos compuestos debido a que remanentes de la primera solución utilizada permanecen en el canal luego de ser aspirados. Estos remanentes entran en contacto con la siguiente solución de la secuencia de irrigación y al combinarse pudieran generar subproductos dentro del canal radicular (Basrani y cols., 2007, Prado y cols., 2013). Estos subproductos pudieran ser tóxicos para los tejidos periapicales e incluso

formar precipitados que pueden obliterar los túbulos dentinarios, interfiriendo así con el correcto sellado del SCR (Bui y cols., 2008, Krishnamurty y Sudhakaran, 2010).

El NaClO a diferentes concentraciones (1%-5,25%) asociado a EDTA al 17%, agua destilada y solución salina, no produce ningún precipitado. Sin embargo, diversos estudios han demostrado múltiples reacciones que se deben tener en consideración a la hora de emplear estas sustancias. Se ha observado que al combinar NaClO con EDTA, AC o ácido fosfórico se genera una reacción exotérmica con la formación simultánea de burbujas (**Figura N°7; F, G y H**), que corresponden principalmente a gas cloro, un producto tóxico liberado por el aumento en la concentración de protones (H^+) en presencia de iones cloro (Prado y cols, 2013). Además, dicha interacción provoca una disminución en la capacidad del NaClO para disolver tejidos orgánicos, debido a que se reduce significativamente su forma catiónica (Cl^+), quedando inefectivo contra bacterias y tejido necrótico. Es por esto, que ambas soluciones deben usarse de forma separada, utilizando irrigantes intermedios para disminuir su interacción y considerando siempre la aplicación de NaClO posterior al uso de EDTA para conseguir el efecto deseado (Grawehr y cols., 2003; Zehnder, 2006). No obstante, diversos estudios sugieren que el uso de NaClO posterior a EDTA puede producir erosión en las paredes del canal dentinario. (Niu y cols., 2002; Quian y cols., 2011).

La combinación de CHX y EDTA genera una reacción ácido-base que produce un precipitado característico de color blanco lechoso (**Figura 7; C**) (Zehnder, 2006, Rasimick y cols. 2008). Por otra parte, la asociación de CHX y una solución salina (suero) produce una precipitación de sal después de 5 segundos. Cuando la CHX se asocia con agua destilada no se produce ningún precipitado (Prado y cols, 2013).

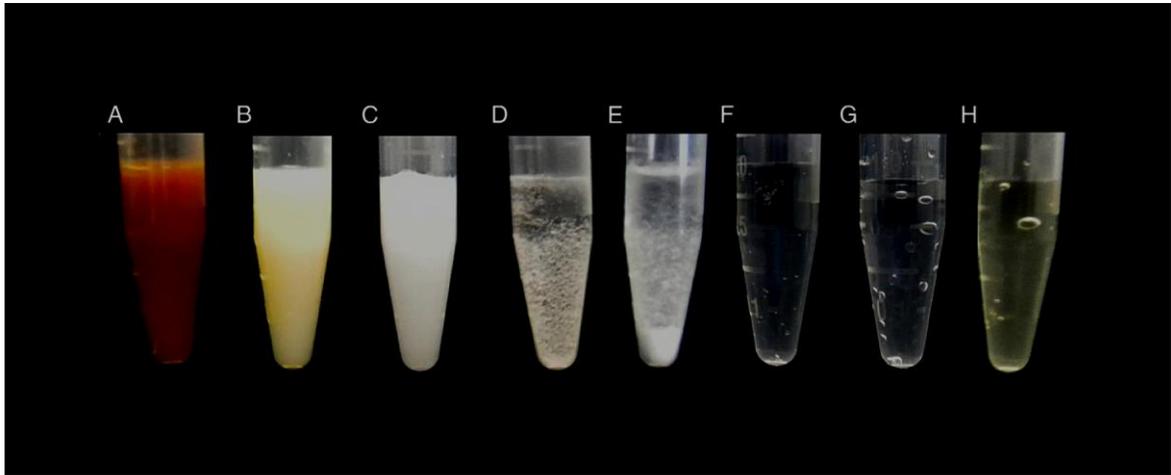


Figura N°7: Aspecto de diversas interacciones entre irrigantes (Prado y cols., 2013)

- | | |
|---|---|
| (A) NaOCl al 5,25% y CHX al 2%; | (F) NaOCl al 5,25% y EDTA al 17%; |
| (B) NaOCl al 0,16% y CHX al 2%; | (G) NaOCl al 5,25% y AC al 10%; |
| (C) EDTA al 17% y CHX al 2%; | (H) NaOCl al 5,25% y Ácido Fosfórico |
| (D) Solución salina y CHX al 2%; | al 37%. |
| (E) Etanol y CHX al 2%; | |

Es importante tener en consideración, que la presencia de diversos precipitados producto de la interacción entre irrigantes puede resultar en la formación de lo que se ha descrito como barro dentinario químico (chemical smear layer), que tendría efectos negativos en la terapia endodóntica debido a que podría ocluir los túbulos dentinarios, interfiriendo así, con el correcto sellado y desinfección del SCR (Vivaqua-Gomes y cols., 2002, Krishnamurthy y cols., 2010, Prado y cols. 2013).

Uno de los precipitados de mayor interés en la actualidad es el que se obtiene por la reacción entre NaClO y CHX, ya que presenta diversas características nocivas que podrían afectar el tratamiento de forma directa, además de sus implicancias biomédicas para la salud del hospedero. A continuación, se ahondará en dicha interacción.

3.2.1 Asociación NaClO y CHX

Al mezclar NaClO a diferentes concentraciones con CHX al 2% se produce un precipitado de color marrón-anaranjado cuyas características no han sido completamente descritas (Basrani y cols. 2007). Este precipitado se genera por la reacción ácido-base entre la CHX, que es un ácido di catiónico que tiene la habilidad de donar protones y el NaClO, compuesto alcalino que es capaz de recibir protones. Dicho intercambio produce la formación de una sustancia neutra e insoluble que precipita en solución (Mohammadi y Abbott, 2009). Diversos autores han demostrado en esta reacción la presencia de un compuesto llamado **Paracloroanilina**, 1-amina-4-clorobenceno, p-cloroanilina o **PCA (Figura N°8)** (Basrani y cols., 2007; Bui y cols., 2008).

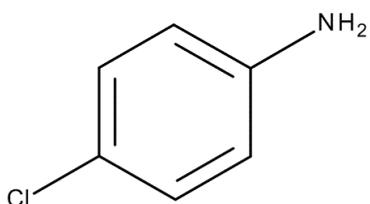


Figura N°8: Estructura molecular, Paracloroanilina

Según Basrani y cols. (2007), la formación y cantidad del precipitado está en relación directa con la concentración de NaClO, siendo 0,023% la menor concentración a la cual se observó cambio de coloración y 0,19% la mínima a la cual se formó el precipitado. Sin embargo, se ha descrito que en ausencia de NaClO, la CHX puede hidrolizarse espontáneamente y formar PCA al exponerse a calor, luz y un ambiente alcalino (Basrani y cols., 2007). Al aumentar la temperatura de la CHX por sobre los 45°C se produce PCA como subproducto, por lo tanto, el uso de CHX no debe combinarse con ultrasonido. Barbin y cols. (2013), detectaron PCA en soluciones de CHX al 2% que fueron almacenadas durante 7 días en condiciones de 95% de humedad relativa y 36,5°C.

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IACR) categoriza la PCA en el Grupo 2B, lo que significa que este agente es potencialmente carcinogénico para los humanos (World Health Organization, 2003).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se trata de un compuesto tóxico ya sea por inhalación, digestión o contacto con la piel, ojos o mucosas. Los efectos tóxicos más prominentes de la PCA se deben a la formación de enlaces covalentes con la hemoglobina y las proteínas en el hígado y los riñones generando problemas en el transporte de oxígeno en la sangre. Estudios toxicológicos en animales han demostrado que la exposición repetida a PCA produce cianosis y metahemoglobinemia seguidas de efectos en el hígado, bazo y riñón, que se manifiestan a través de cambios en los parámetros hematológicos, esplenomegalia y hemosiderosis de moderada a grave en el bazo, el hígado y el riñón, parcialmente acompañada de hematopoyesis extramedular. Estos efectos se producen tras una hemólisis excesiva inducida por el compuesto y son coherentes con una anemia hemolítica (World Health Organization, 2006).

Según la IACR (2015), la PCA es ampliamente aceptada como un compuesto potencialmente neoplásico, ya que, a pesar de haber poca evidencia en humanos, en animales se ha observado que ante la exposición de este compuesto ocurre la formación de tumores infrecuentes, como fibrosarcomas y osteosarcomas. En humanos se han reportado principalmente intoxicaciones durante el proceso de producción industrial de este compuesto.

El nivel máximo tolerable de exposición humana a PCA está en el orden de $2\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día, al considerar sólo los efectos no neoplásicos como la metahemoglobinemia. La exposición accidental aguda a concentraciones altas de PCA puede ser mortal (Boehncke y cols., 2003).

En un estudio realizado por Krishnamurty y Sudhakaran (2010), se examinó bajo estereomicroscopía la formación de PCA luego de utilizar distintos irrigantes intermedios entre NaClO 2,5% y CHX 2%. Determinaron formación inmediata del precipitado dentro del canal radicular al usar agua destilada y solución salina como irrigantes intermedios, mientras que en los canales irrigados con alcohol absoluto previo al uso de CHX no hubo evidencia de formación del precipitado. Sin embargo, el uso de alcohol absoluto como irrigante endodóntico no está bien establecido y la biocompatibilidad del alcohol con los tejidos periapicales sigue siendo una preocupación (Prado y cols. 2013).

Riquelme y cols. (2015), en un estudio *in vitro* evaluaron el efecto del suero fisiológico y agua destilada en la formación de PCA. Se observó que el suero fisiológico disminuye la formación de PCA ya que interactúa con CHX, formando una precipitación salina, dejando menos CHX disponible para reaccionar con NaClO y producir PCA. Por otra parte, el agua destilada disminuye la formación de PCA, pero no la elimina por completo, ya que sólo reduce la concentración de NaClO residual mediante una dilución de éste, pero no genera ningún tipo de precipitación al interactuar con la CHX.

Según Prado y cols. (2013), al caracterizar los subproductos formados al asociar los irrigantes más usados en endodoncia como NaClO a diferentes concentraciones (0,16%-5,25%), CHX 2%, EDTA 17%, AC 10%, Ácido Fosfórico 37%, NaCl 0,9%, alcohol y agua destilada observaron que al utilizar agua destilada como irrigante intermedio entre NaOCl y CHX al 2 % (gel/solución), no se formaron precipitados. Así, concluyeron que el agua destilada parece ser la solución más indicada para prevenir o reducir la formación de estos subproductos.

3.3 Permeabilidad dentinaria y PCA

La permeabilidad dentinaria se relaciona directamente con diversos factores propios de la estructura dentaria. Dentro de los elementos que influyen en esta característica, la cantidad de túbulos dentinarios y el diámetro de los mismos presentan un efecto directamente proporcional en el nivel de permeabilidad. Asimismo, la presencia de detritus o barro dentinario en la superficie dentinaria genera un decrecimiento debido a la obliteración de la estructura tubular (Pashley DH, 1985, Foster y cols., 1993 y Ventura, 2016)

La PCA se presenta como una sal neutra insoluble, de gran relevancia en el éxito de la terapia endodóntica ya que puede obliterar los túbulos dentinarios adhiriéndose en las paredes del canal radicular, siendo un precipitado de difícil eliminación. Este efecto genera una disminución en la permeabilidad dentinaria, que interfiere directamente con la correcta difusión de irrigantes y medicación intracanal, además de favorecer la microfiltración del relleno endodóntico al interferir en la

adaptación y penetración de los materiales de sellado utilizados en la etapa de OCR. Adicionalmente, su presencia puede provocar tinción dentaria debido a la difusión del pigmento en las paredes dentinarias (Krishnamurthy y Subhakaran, 2010).

Algunos estudios han analizado la ultraestructura de las paredes dentinarias del canal radicular con microscopía electrónica de barrido (SEM) después de la irrigación con NaClO y CHX en distintas concentraciones para determinar la presencia de precipitados. Se ha detectado obliteración de los túbulos dentinarios en el tercio medio y cervical del canal radicular, lo que podría comprometer la limpieza y sellado del SCR y, por ende, afectar el éxito del tratamiento (Gasic y cols. 2012, Bui y cols, 2008, Krishnamurthy y Sudhakaran 2011; Mortenson y cols., 2012). Por esta razón, se sugiere el uso de irrigantes intermedios entre NaClO y CHX para prevenir así la formación del precipitado (Gasic y cols., 2012; Mortenson y cols., 2012).

Debido a que la PCA ha sido ampliamente reconocida como una sustancia nociva para la salud y con posibles implicancias directas en el tratamiento endodóntico, se vuelve indispensable poder predecir y prevenir su formación al realizar el protocolo de irrigación y medicación intracanal. De esta manera, se han propuesto diversos irrigantes intermedios con el objetivo de evitar o disminuir su formación. Se ha sugerido la utilización de EDTA, ácido cítrico, agua destilada, alcohol en distintas concentraciones, suero fisiológico, etc., sin embargo, en la actualidad no existe un consenso respecto de cómo evitar la interacción entre irrigantes o medicamentos y qué efectos produce a nivel de los túbulos dentinarios de las paredes del canal radicular (Haapasalo y cols., 2010)

Este estudio busca determinar el efecto del uso de distintos irrigantes intermedios entre NaClO 5% y la medicación con CHX 2% en la formación de PCA y en el grado de obliteración de los túbulos dentinarios de las paredes del canal radicular, visualizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

4. HIPÓTESIS

La cantidad de PCA que se forma y el grado de obliteración de túbulos dentinarios de las paredes del canal radicular varía al utilizar distintos irrigantes intermedios entre Hipoclorito de Sodio al 5% y la medicación con Clorhexidina al 2%

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el grado de obliteración de los túbulos dentinarios y la cantidad de PCA que se forma al utilizar distintos irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y la medicación con CHX al 2% durante protocolo de irrigación endodóntica.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración de NaClO en cada etapa del tratamiento endodóntico.
2. Determinar las concentraciones de PCA formadas al interaccionar NaClO al 5 % con CHX al 2%, al utilizar agua destilada, suero fisiológico y etanol al 70% como irrigantes intermedios durante el tratamiento endodóntico.
3. Determinar el grado de obliteración de los túbulos dentinarios en las paredes del canal radicular al utilizar suero fisiológico, agua destilada y etanol al 70% como irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y la medicación con CHX al 2%.
4. Comparar el grado de obliteración de los túbulos dentinarios en las paredes del canal radicular al utilizar suero fisiológico, agua destilada y etanol al 70% como irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y la medicación con CHX al 2%.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Tipo de estudio

Estudio prospectivo, experimental y explicativo *ex vivo*. El tamaño muestral (n) será de 30.

7.2 Materiales

Tabla N°2: Materiales para procedimientos clínicos

<ul style="list-style-type: none"> • Turbina, micromotor y contrángulo convencionales
<ul style="list-style-type: none"> • Dispositivo para la toma de muestras (Anexo 3)
<ul style="list-style-type: none"> • Piedras de diamante redondas de alta velocidad N°12, N°14. SS White Burs, Inc.1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA.
<ul style="list-style-type: none"> • Fresas carbide redondas de baja velocidad N°12 y N°14 SS White Burs, Inc.1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA.
<ul style="list-style-type: none"> • Fresas Endo Z® de baja velocidad Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse.
<ul style="list-style-type: none"> • Fresas Gates Glidden N° 1-2-3 MANI, INC. 743 Nakaakutsu, Takanezawa, Shioya, Tochigi 329-1234, Japan.
<ul style="list-style-type: none"> • Jeringas de Irrigación, Monoject®. Covidienlic, 15 Hampshire, Mansfield, MA 02048 USA.
<ul style="list-style-type: none"> • Limas tipo Kerr Subserie, 1era y 2da Serie, Maillefer®, 25 mm Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse.
<ul style="list-style-type: none"> • Conos de papel estériles RITE-DENT MFG, CORP. 3750 East 10 Court Hialeah, Florida 33013, USA.
<ul style="list-style-type: none"> • Hipoclorito de Sodio 5%. NaOCl, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA.
<ul style="list-style-type: none"> • Clorhexidina Digluconato solución tópica 2%. Chlorhexidine Digluconato solution 20% in H2O, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA.
<ul style="list-style-type: none"> • EDTA 10% EDTA, Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany.
<ul style="list-style-type: none"> • Cloruro de Sodio 0,9% J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, 55320, Edo de Mex. Mexico, Made in USA printed in Mexico.
<ul style="list-style-type: none"> • Agua Destilada Laboratorio de Química, Facultad de Odontología, U. de Chile.

Tabla N°3: Materiales y reactivos para procedimientos de laboratorio

Todas las soluciones y diluciones usadas en la investigación fueron preparadas en el laboratorio de Química de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

- Tubos Eppendorf 1,5 ml
Biologix Group Limited, No.2766 Ying XiuRoad,High-Tech Industrial Development Zone Jinan, Shandong 250101 P.R. China.
- Micropipetas 100 y 1000 Labopette®
Hirschmann, Inc. Holloway Road, Suite 104 Bluegrass Industrial Park. Louisville, KY 40299, USA.
- Centrífuga Hermle z216 MK.
HERMLE Labortechnik GmbH,Siemensstr 25 D-78564, Wehingen, Alemania.
- Ácido Clorhídrico
J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, 55320, Edo de Mex. Mexico, Made in USA printed in Mexico
- Nitrito de Sodio
Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania.
- Sulfamato de Amonio.
Sigma-Aldrich ChemieGmbH Munich, Germany
- Naftiletilindiaminadihidrocloruro.
Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA.
- Ethanol
Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania.
- Espectrofotómetro UNICAM®UV/VIS
ThermoSpectronicUnicam UV-530 UV-Visible, Rochester, NY, USA
- Cubetas de cuarzo 1cc.
Scientech, Inc. 5649 ArapahoeAvenue Boulder, CO 80303-1399, USA

Tabla N°4: Materiales para análisis microscópico

- Microscopio electrónico de barrido Jeol Modelo JSM IT300LV
- Secador de punto crítico AUTOSAMDRI-815, SERIES A OVERVIEW
- Metalizador DENTON VACUMM DESK V..
- Discos de acero diamantado de 0,2 mm
SS White Burs, Inc.1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA.
- Hachuela de esmalte 15-8-12 (para fractura longitudinal de muestras)
Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse.

7.3 Selección de la muestra

En el presente estudio se realizó la comparación de la concentración de PCA después de utilizar suero fisiológico como grupo control y alcohol al 70% y agua destilada como grupo experimental como irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y CHX al 2%. En este contexto, la fórmula matemática que permitió calcular el tamaño muestral n para la comparación de dos medias (SEQC, 2008) fue la siguiente (Figura N°9):

$$n = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

Figura N°9: Ecuación de cálculo de tamaño muestral para comparación de dos medias (SEQC, 2008). Donde:

z_{α} es el valor z correspondiente al riesgo deseado;

z_{β} es el valor z correspondiente a la potencia estadística deseada;

s^2 es la varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control;

d es el valor mínimo de la diferencia que se desea detectar.

Para la aplicación de esta fórmula se utilizó el dato de desviación estándar (s) del grupo control en un estudio previo donde se determinó el contenido residual de PCA que se produce al utilizar suero fisiológico como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2% (Tabla N°5) (Alegre, 2015).

Tabla N°5: Concentración de PCA medida en el estudio de Alegre (2015)

Concentración mínima	0,00004012%
Concentración máxima	0,0013235%
Concentración promedio	0,0007312%
Desviación estándar	0,0002230

Basado en este estudio también se estableció el valor mínimo de diferencia que se desea detectar (d), este valor corresponde a la diferencia entre la concentración promedio y la concentración mínima de PCA, teniendo un valor de 0,00033 en este caso.

Por lo tanto, si se acepta un riesgo de 0,05 ($z_{\alpha} = 1,92$) y una potencia estadística del 90% ($z_{\beta} = 1,282$), se tiene que (Figura N°10):

$$n = \frac{2(1,960 + 1,282)^2 0,000223^2}{0,00033^2} = 9,59996$$

Figura N°10: Cálculo de tamaño muestral (n).

Se corroboró esta medición utilizando el software Calculadora de tamaño muestral GRANMO (IMIM, 2012).

Según el software utilizado, se precisó de un $n = 10$ para detectar una diferencia igual o superior a 0.00033 (IMIM, 2012), resultado que se condice con el resultado obtenido previamente en la ecuación de cálculo de tamaño muestral (Figura N°10).

Sobre las muestras obtenidas se realizaron los siguientes procedimientos divididos en: (1) procedimientos clínicos donde se aplicó el protocolo endodóntico, (2) procedimientos de laboratorio para determinación de concentraciones de los compuestos de interés y (3) procedimientos para análisis y conteo tubular en microscopía electrónica de barrido (MEB).

7.4 Procedimientos clínicos

7.4.1 Recolección de la muestra

Para plantear el modelo *ex vivo* de este estudio, se recolectaron y seleccionaron 30 dientes humanos extraídos por indicación protésica, ortodóntica o periodontal. Los criterios de inclusión de la muestra fueron dientes permanentes maduros y sanos, libres de caries u obturaciones, unirradiculares, con raíces/canales rectos o con curvatura leve, de calibre amplio a medio al observarlos en la radiografía.

La obtención de las muestras se realizó desde exodoncias efectuadas en la clínica de Cirugía Maxilofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Previo a la recolección se explicó oportunamente al paciente de las características del procedimiento y del estudio a participar, donde se solicitó la autorización mediante la firma de Consentimiento informado detallado en el **Anexo 2**. En el caso de menores de edad la autorización fue otorgada por el respectivo apoderado.

Una vez recolectados, los dientes fueron limpiados y debridados con ultrasonido y curetas periodontales. Se tomaron radiografías de todas las muestras y posteriormente fueron almacenadas bajo refrigeración a 4°C.

7.4.2 Tratamiento endodóntico y obtención de muestras por etapa:

Los dientes obtenidos se dividieron en tres grupos: un grupo control (N=10) y dos grupos experimentales (N=20).

A los dientes del grupo control se les realizó un tratamiento endodóntico desde la cavidad de acceso hasta terminar la PQM y realizar medicación intracanal, utilizando el protocolo de irrigación endodóntica que se aplica en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile detallado en el **Anexo 1**.

El proceso de aspiración/eyección del contenido del canal radicular en cada fase del tratamiento se efectuó mediante un dispositivo especialmente diseñado para la investigación (creado y construido por el académico de la Universidad de Chile Dr. Mauricio Ruiz Nolf), el que se muestra en la **Figura N°11**. Los detalles del dispositivo de succión se describen en el **Anexo 3**.



Figura N°11. Dispositivo toma de muestras Dr. Mauricio Ruiz Nolf

La recolección de muestras intracanal se realizó **12 Fases consecutivas** siguiendo la secuencia de tratamiento del protocolo endodóntico tal como se muestra en la **Tabla N°6**.

El grupo control consideró suero fisiológico como irrigante intermedio de acuerdo al protocolo de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. En los grupos experimentales se modificó el irrigante intermedio, aplicando la misma secuencia de tratamiento.

Tabla N°6 Fases del tratamiento endodóntico y recolección de muestras.

Fase	Procedimiento	Recolección
1	Cavidad de acceso endodóntico con irrigación intermitente con 3 ml de NaClO al 5%.	N°1: obtenida posterior a comunicar con cámara pulpar, permeabilizar canal y finalizados los desgastes compensatorios.
2	Preparación del tercio cervical y medio del canal dentinario.	N°2: luego de utilizar cada fresa Gates-Glidden.
3	Preparación del tercio apical.	N°3: obtenida durante la irrigación entre cada lima de la secuencia.
4	Retroceso (step-back).	N°4: obtenida durante la irrigación entre cada lima de la secuencia.
5, 6 y 7	Irrigación con 3 ml de suero fisiológico 0.9% como irrigante intermedio (IRRI).	N°5, 6 y 7: obtenida durante cada IRRI.
8	Irrigación con 1 ml de EDTA al 10%.	N°8
9, 10 y 11	Irrigación con 3 ml de suero fisiológico 0.9% como irrigante intermedio (IRRI).	N°9, 10 y 11: obtenida durante cada IRRI.
12	Medicación con 3 ml de CHX al 2%.	N°12: obtenida durante la medicación con CHX.

Los 12 volúmenes recolectados en cada fase fueron guardados en frascos de vidrio previamente esterilizados y cerrados, los que se almacenaron en el laboratorio refrigerados hasta el momento de su análisis.

A los dientes de los grupos experimentales se les aplicó el mismo protocolo clínico de irrigación/medicación descrito en la **Tabla N°6**, sustituyendo el suero fisiológico como IRRi por **agua destilada (n=10)** y por **alcohol al 70% (n=10)** respectivamente en las **fases 5, 6, 7, 9, 10 y 11**. Los irrigantes fueron utilizados en el mismo volumen que el suero fisiológico, es decir, el equivalente a tres jeringas de irrigación de 3 mililitros según el protocolo.

7.5 Procedimientos de laboratorio

Con motivo de almacenamiento, las muestras recolectadas fueron trasladadas a tubos Eppendorf de 1,5 ml, centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos con el fin de precipitar posibles residuos y detritus presentes posterior a su recolección. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a -20°C hasta el momento de su análisis químico.

Por medio del método espectrofotométrico, las muestras fueron analizadas obteniendo su espectro de absorción en el rango UV-visible de 200-800 nm. Se midió la absorbancia y determinó la concentración de NaClO desde las fases 1 a la 11 y de PCA en la fase 12.

Con el fin de lograr este objetivo se realizaron en forma secuencial los siguientes procedimientos:

7.5.1 Determinación de la concentración de NaClO

Para determinar la concentración de NaClO, se utilizó una curva de calibración previamente confeccionada por Quiroz y cols. (2015) utilizando espectroscopia UV (ultravioleta), leyendo los valores de absorbancia de las muestras a un lambda máximo (λ_{max}) de 292 nm. La curva representada en el **Gráfico N°1** está dada para concentraciones entre 0,0005% y 0,05% de NaClO, con

la cual se determinó la concentración de NaClO recolectado en cada fase anteriormente descrita (Fase 1 a la 11).

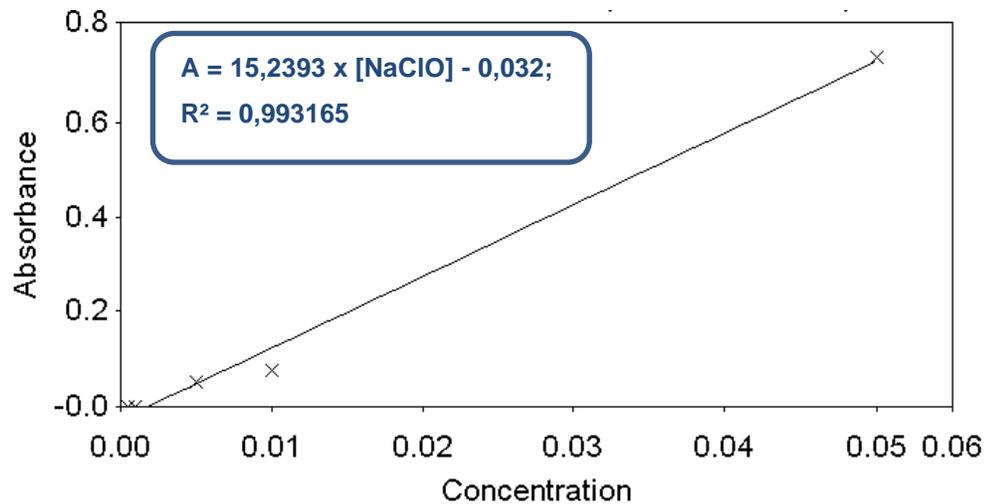


Gráfico N°1: Curva de calibración de NaClO (Quiroz y cols., 2015)

A: Absorbancia. [NaClO]: Concentración de NaClO

Utilizando un espectrofotómetro UNICAM® UV/VIS se midió el valor de absorbancia de las muestras, previamente depositadas en una cubeta de cuarzo de 1 cc a un λ_{\max} de 292 nm. Para esto se usó como control blanco agua destilada para la calibración del equipo. Los valores obtenidos fueron traspasados a la ecuación de calibración para conseguir así las concentraciones respectivas de cada sustancia.

En las muestras correspondientes a la Fase 1, 2, 3 y 4 donde la concentración se encontraba en rangos mayores a los comprendidos en la curva de calibración se realizó una dilución de 100x con agua destilada. Mientras que en las Fases 5, 6, 7, 9, 10 y 11 se midió directamente ya que las muestras se encontraban en los rangos de concentración permitidos en la curva (0,0005% a 0,05%).

Las concentraciones fueron comprobadas realizando el reemplazo de los valores de absorbancia obtenidos en la ecuación de calibración representada en la **Figura N°12**. Teniendo en consideración que las muestras diluidas debieron ser multiplicadas por el factor de dilución (x100) para conocer la concentración real del irrigante en cada etapa.

$$[NaClO] = \frac{A + 0.032}{15.2393}$$

Figura N°12: Ecuación de la curva de calibración para NaClO

[NaClO]: Concentración de NaClO. A: Absorbancia

7.5.2 Determinación de la concentración de PCA

Para conocer la concentración de PCA en las muestras se utilizó el protocolo de detección de Paracloroanilina descrito en la Farmacopea Europea (2005) modificado por Alegre y cols. (2014).

El protocolo ajustado fue el siguiente:

- A 1ml de muestra se agregó 250 μ L ácido clorhídrico diluido (73g/L) y se diluyó hasta 2mL.

Luego se agregó y agitó después de la adición de las siguientes sustancias, para obtener una correcta incorporación.

- 36 μ L de Nitrito de Sodio (solución 100g/L)
- 200 μ L de Sulfamato de Amonio (solución 50g/L)
- 500 μ L Naftil etilIndiamina dihidrocloruro (solución 1g/L)
- 100 μ L de Alcohol (Solución Etanol 96%)

Se diluyó hasta 5 ml con agua y se dejó reposar por 30 minutos.

Para determinar la concentración de PCA, se utilizó una curva de calibración previamente confeccionada por Quiroz y cols. (2015) utilizando espectroscopia UV

(ultravioleta), leyendo los valores de absorbancia en el rango visible (350–800 nm). La curva representada en el **Gráfico N°2** fue construida para leer el complejo coloreado que forma PCA a 552 nm, para concentraciones de entre 0,00005% y 0,001%, con la cual se determinó la concentración de PCA presente en las muestras correspondientes a la Fase 12 antes descrita.

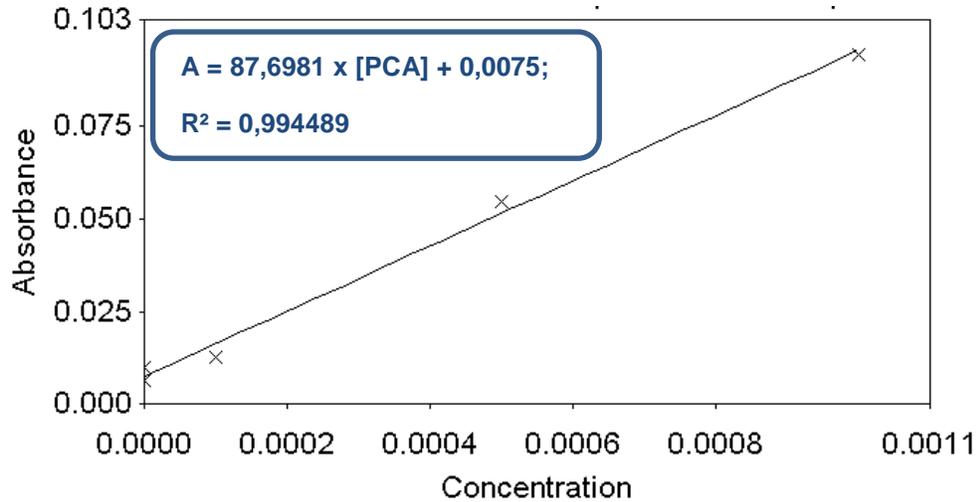


Gráfico N°2: Curva de calibración de PCA (Quiroz y cols., 2015)

A: Absorbancia. [NaClO]: Concentración de NaClO

Los valores de absorbancia fueron reemplazados en la ecuación de la curva que se muestra en la **Figura N°13**, donde se obtuvo finalmente la concentración de PCA de la Fase 12, donde se aplicó CHX al 2% como medicación intracanal.

$$[PCA] = \frac{A + 0.0075}{87.6981}$$

Figura N°13: Ecuación de la curva de calibración para PCA.

[PCA]: Concentración de PCA. A: Absorbancia.

7.6 Análisis estadístico de concentraciones

Las concentraciones de NaClO y PCA obtenidas en el grupo control (suero fisiológico) y grupos experimentales (agua destilada y alcohol al 70%) fueron analizadas estadísticamente para buscar diferencias significativas entre los valores de los distintos grupos. Los datos obtenidos fueron sometidos al test estadístico Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución, donde se observó una distribución no normal y se definió el carácter no paramétrico de las muestras.

Para comparar los 3 grupos de IRRi estudiados se realizó un análisis de varianza de Kruskal-Wallis para establecer el grado de significancia utilizando el software estadístico STATA v14.0. Se fijó un intervalo de confianza del 95% aceptando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Para poder realizar un análisis estadístico más representativo de las muestras estudiadas, los datos obtenidos en las fases antes descritas fueron agrupados en un consolidado de 4 conjuntos, divididos de acuerdo a las etapas del tratamiento endodóntico y a la concentración de sustancia de interés a medir (NaClO o PCA), como se muestra en la **Figura N°14**.

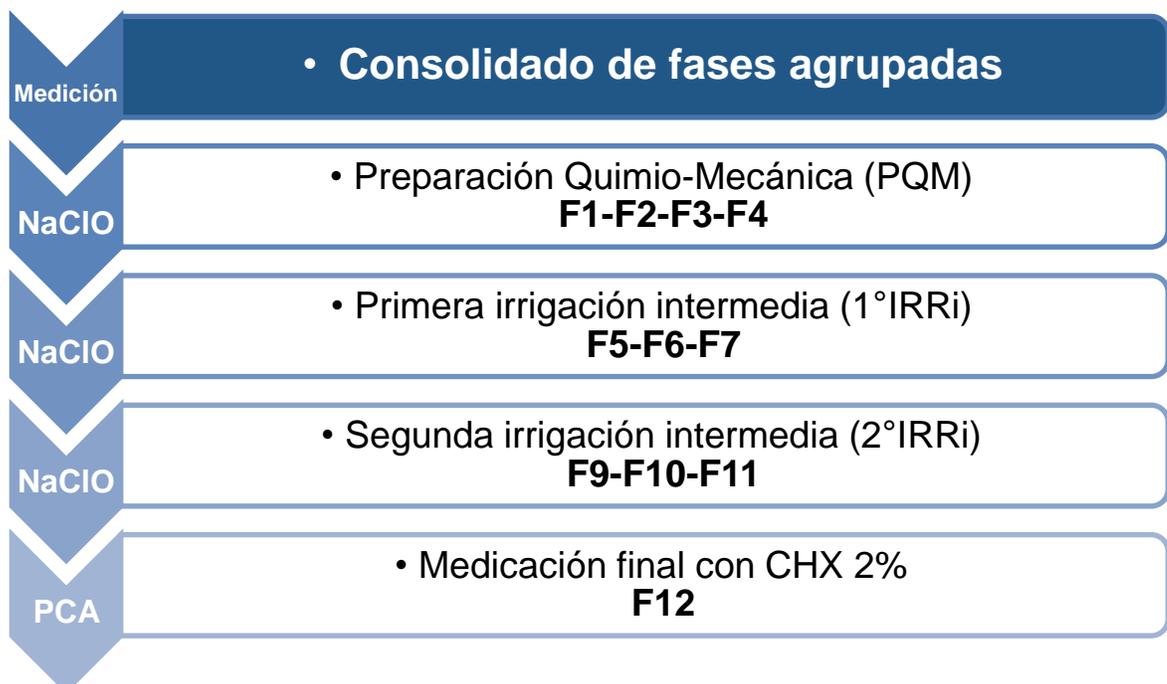


Figura N°14: Fases consolidadas para análisis estadístico.

7.7 Determinación de grados de obliteración de túbulos dentinarios

Posteriormente a los procedimientos anteriormente descritos, todos los dientes fueron almacenados a 4°C hasta el momento de someterse a los siguientes procedimientos y análisis.

Mediante el uso del servicio de microscopía electrónica de barrido (MEB) de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile correspondiente al “*Proyecto FONDEQUIP EQM130076*” se analizaron las características de la estructura tubular al interior de las paredes del sistema de canales radiculares de las muestras previamente tratadas según el protocolo endodóntico ya mencionado. Para esto, los dientes fueron sometidos a los procedimientos a continuación descritos:

7.7.1 Corte Dentario

Todos los dientes fueron seccionados en dos mitades según la secuencia específica de corte dentario descrita en el **Anexo 4**. Para de esta forma obtener una visualización de la extensión total del canal dentinario como se aprecia en la **Figura N°15** y así posteriormente poder observar la ultraestructura a través de MEB.



Figura N°15. Dientes seccionados longitudinalmente en dos partes luego de realizado el protocolo endodóntico

7.7.2 Preparación de las muestras para visualización en MEB

Las muestras que se desea visualizar a través de microscopía electrónica de barrido deben cumplir dos condiciones fundamentales, en especial si se trata de tejidos biológicos: Deben estar secas y ser conductoras de electricidad. Para esto se sometió a los dientes previamente seccionados a un proceso de fijación y deshidratación química en el laboratorio, el que finalizó con un secado de punto crítico de las muestras. Posteriormente y para otorgarle mayor conductividad a los especímenes se realizó el recubrimiento o “sputtering” con oro (Au) para así obtener mejores condiciones de imagen. (**Ver Anexo 5**) A continuación se describen los procedimientos:

1. Etapa de deshidratación: Se sumergió cada muestra en alcoholes ascendentes de 50°,70°,95°,100° I y 100° II durante 5 minutos cada uno.
2. Etapa de secado de punto crítico: Se colocaron las muestras en el Secador de punto crítico (AUTOSAMDRI-815, SERIES A OVERVIEW) durante 45 minutos, donde cada muestra fue secada para remover las moléculas de agua a través de CO₂.
3. Etapa de Metalizado con oro: Una vez secas las muestras fueron montadas en porta muestras de aluminio y posteriormente se metalizaron con oro en METALIZADOR DENTON VACUMM DESK V.
4. Las muestras fueron almacenadas en cápsulas Petri hasta su utilización.

Figura N°16.



Figura N°16. Dientes seccionados longitudinalmente, secados a punto crítico y metalizados con oro sobre porta muestras de aluminio.

7.7.3 Selección de áreas de análisis y recuento tubular

Las muestras fueron observadas mediante el microscopio electrónico de barrido *Jeol Modelo JSM IT300LV*, bajo el protocolo de visualización descrito en el **Anexo 6**.

Se seleccionaron 5 áreas de $100 \times 100 \mu\text{m}$ de cada sección del canal radicular magnificadas $\times 850$ a diferentes alturas del canal para obtener un total de 10 áreas. Las imágenes fueron elegidas desde la porción central del canal para conseguir una visión directamente perpendicular a la superficie, a modo de evitar discrepancias debido a la dirección de los túbulos dentinarios. Se escogieron imágenes representativas en la extensión de los tercios del canal. **Figura N°17.**

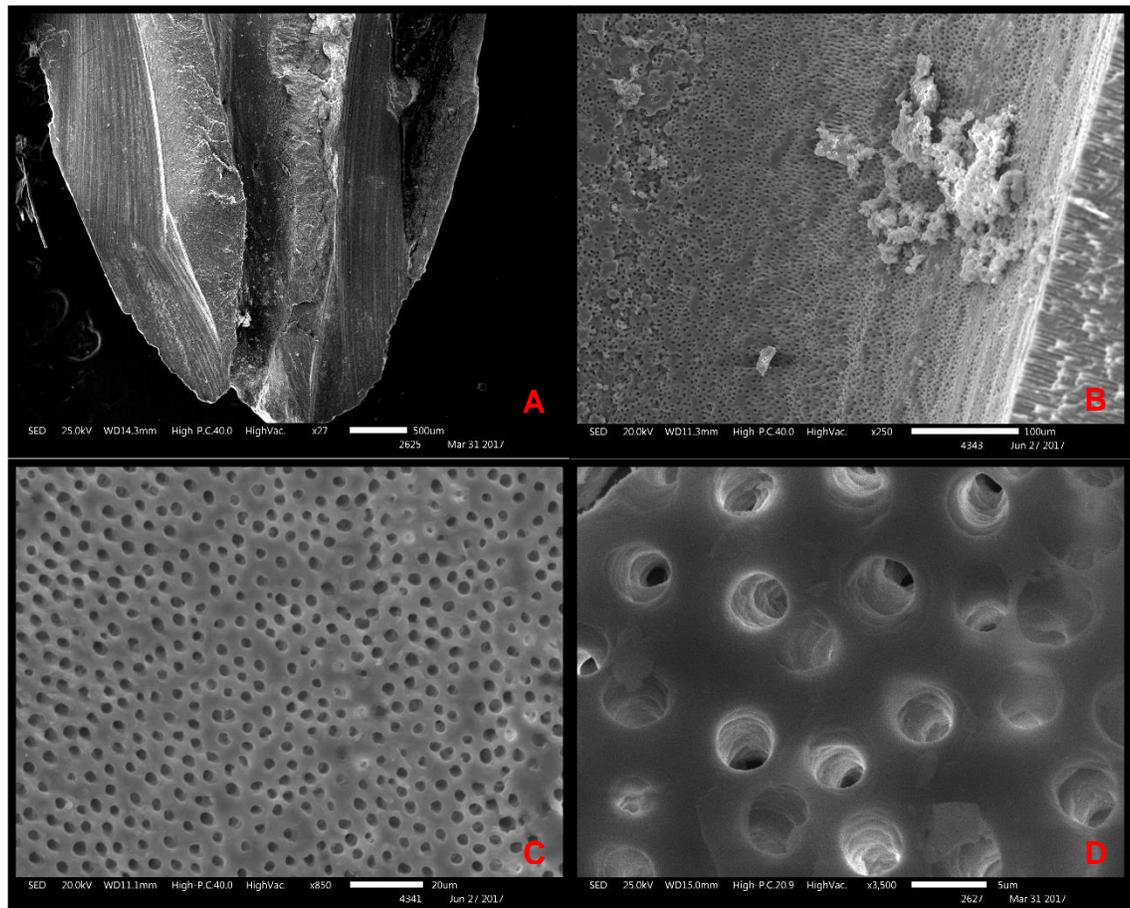


Figura N°17: Microfotografías obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido MEB.

- (A)** Visión de la ubicación del canal dentinario en la porción apical a 27X de aumento. **(B)** Variación en la orientación de los túbulos dentinarios al interior del canal a 250X. **(C)** Porción central y frontal de los túbulos dentinarios en tercio medio a 850X. **(D)** Túbulos dentinarios permeables, imagen a 1500X.

Posteriormente, una vez seleccionadas las imágenes de los 30 dientes a estudiar, fueron guardadas y almacenadas en formato Tiff. Se procedió a realizar el conteo tubular mediante la selección de un área delimitada por una rejilla de 100x100 μm , subdividida en 25 áreas de 20x20 μm cada una, como se muestra en la **Figura N°18**.

Para este análisis se utilizaron los siguientes criterios respecto del grado de obliteración de los túbulos dentinarios:

- Abierto: túbulo dentinario totalmente abierto sin signo alguno de detritus o depósitos. (Figura N°19-a)

- Parcialmente ocluido: túbulo parcialmente visible (25%, 50% ó 75% de su porción). (Figura N°19-b)
- Totalmente ocluido: Se detecta evidencia de túbulo no visible debido a la presencia de detritus que impiden la visualización en más del 75%. (Figura N°19-c)

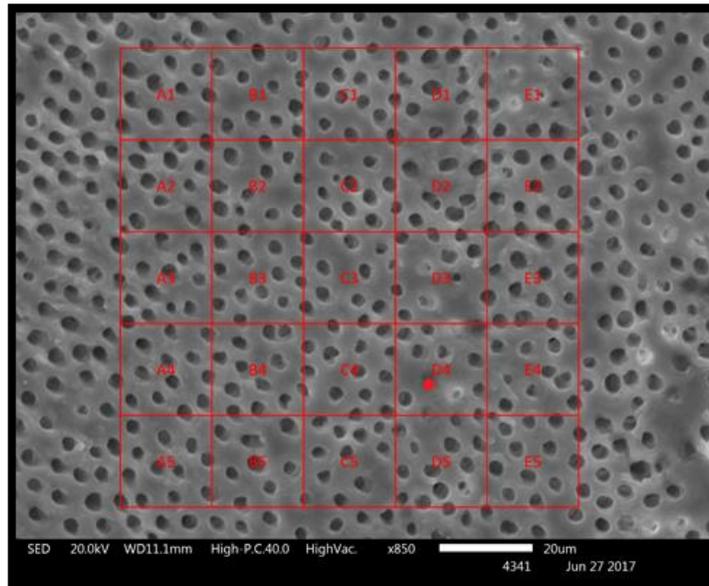


Figura N°18. Microfotografía con superposición de rejilla para conteo tubular.

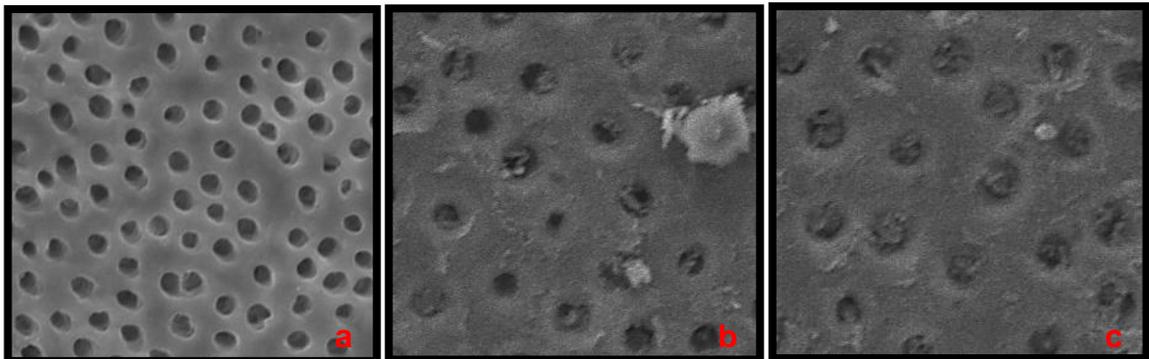


Figura N°19: Microfotografías: **(a)** Túbulos abiertos. **(b)** Túbulos parcialmente ocluidos. **(c)** Túbulos totalmente ocluidos.

El conteo de los túbulos fue realizado manualmente por un solo operador previamente calibrado, y se revisaron los resultados utilizando el software de análisis de imagen Aphelion™ Dev versión 4.4.0. Los resultados fueron divididos

según grupo de estudio (Suero Fisiológico, Agua Destilada y Alcohol al 70%) y por grado de obliteración tubular.

7.8 Análisis estadístico del grado de obliteración de los túbulos dentinarios

A través del análisis de los resultados se buscó establecer la presencia de diferencias significativas entre los grados de obliteración de los túbulos dentinarios en los 3 grupos de estudio: suero fisiológico, agua destilada y alcohol al 70%. Los datos obtenidos fueron sometidos al test estadístico Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución, donde se observó una distribución no normal.

Para comparar los 3 grupos de IRRi estudiados se realizó un análisis de varianza de Kruskal-Wallis, debido a que los datos eran de carácter no paramétrico. Para establecer el grado de significancia, se utilizó el software estadístico STATA v14.0, fijando un intervalo de confianza del 95% aceptando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

8. RESULTADOS

A continuación, se muestran las concentraciones obtenidas mediante espectrofotometría en los tres grupos estudiados y según las fases del tratamiento agrupadas como se describió anteriormente en la **Figura N°14**.

8.1 Concentración de NaClO

Utilizando los valores de absorbancia obtenidos por medio del método de espectrofotometría y las curvas de calibración de cada sustancia, se determinaron las concentraciones de NaClO en las etapas de instrumentación (PQM) y en durante la IRRi realizadas con los diferentes agentes irrigantes utilizados en este estudio, previo a la aplicación de la medicación con CHX al 2%. Se evaluó suero fisiológico (**Tabla N°7**) en el grupo control y agua destilada (**Tabla N°8**) y alcohol al 70% (**Tabla N°9**) en los grupos experimentales.

Tabla N°7: Concentraciones de NaClO en las fases previas a la medicación con CHX al 2% en el grupo control (NaCl 0,9%)

	[NaClO]_{Máx}	[NaClO]_{Min}	Media	DS
PQM	5,38739	3,84860	4,61684	0,48206
1°IRRI	0,02738	0,00439	0,01419	0,00675
2°IRRI	0,01089	0,00343	0,00695	0,00312

PQM: Preparación quimio-mecánica. **1°IRRI:** Primera irrigación intermedia. **2°IRRI:** Segunda irrigación intermedia. **[NaClO]_{Máx}:** Concentración máxima de NaClO. **[NaClO]_{Min}:** Concentración mínima de NaClO. **DS:** Desviación estándar.

Tabla N°8: Concentraciones de NaClO en las fases previas a la medicación con CHX al 2% en el grupo experimental de Agua Destilada

	[NaClO]_{Máx}	[NaClO]_{Min}	Media	DS
PQM	5,08389	4,24560	4,84487	0,24731
1°IRRI	0,02368	0,01139	0,01792	0,00413
2°IRRI	0,01087	0,00918	0,00993	0,00056

PQM: Preparación quimio-mecánica. **1°IRRI:** Primera irrigación intermedia. **2°IRRI:** Segunda irrigación intermedia. **[NaClO]_{Máx}:** Concentración máxima de NaClO. **[NaClO]_{Min}:** Concentración mínima de NaClO. **DS:** Desviación estándar.

Tabla N°9: Concentraciones de NaClO en las fases previas a la medicación con CHX al 2% en el grupo experimental de Alcohol al 70%

	[NaClO]_{Máx}	[NaClO]_{Min}	Media	DS
PQM	5,00679	4,73446	4,89261	0,08713
1°IRRI	0,02403	0,01194	0,01475	0,00354
2°IRRI	0,00302	0,00240	0,00263	0,00018

PQM: Preparación quimio-mecánica. **1°IRRI:** Primera irrigación intermedia. **2°IRRI:** Segunda irrigación intermedia. **[NaClO]_{Máx}:** Concentración máxima de NaClO. **[NaClO]_{Min}:** Concentración mínima de NaClO. **DS:** Desviación estándar.

Posteriormente se realizó la comparación entre las concentraciones de NaClO de los 3 grupos evaluados en las fases previas a la medicación con CHX al 2% (PQM, 1°IRRI y 2°IRRI) como se muestra en la **Tabla N°10** y luego, con el fin

de establecer diferencias al interior de los grupos se compararon alternadamente ambos grupos experimentales con el grupo control (**Tabla N°11 y Tabla N°12**) y las diferencias entre los grupos experimentales (**Tabla N°13**).

Tabla N°10: Comparación de concentraciones de NaClO en los 3 grupos de estudio, previo a la medicación con CHX al 2%

Hipoclorito de Sodio (NaClO)

	Grupo Control NaCl 0,9%		Grupo Experimental Agua Destilada		Grupo Experimental Alcohol 70%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
<i>PQM</i>	4,6168	0,4820	4,8448	0,2473	4,8926	0,0871	0,2124
<i>1° IRRi</i>	0,0141	0,0067	0,0179	0,0041	0,0147	0,0035	0,1809
<i>2° IRRi</i>	0,0069	0,0031	0,0099	0,0005	0,0026	0,0001	0,0001

PQM: Preparación quimio-mecánica. **1°IRRI:** Primera irrigación intermedia. **2°IRRI:** Segunda irrigación intermedia. **[NaClO]_{Máx}:** Concentración máxima de NaClO. **[NaClO]_{Mín}:** Concentración mínima de NaClO. **DS:** Desviación estándar. **NaCl 0.9%:** Suero Fisiológico. ***p*:** Significancia

Tabla N°11: Comparación de concentraciones de NaClO entre grupo NaCl 0.9% y Agua destilada, en las fases previas a la medicación de CHX al 2%

Hipoclorito de Sodio (NaClO)

	Grupo Control NaCl 0,9%		Grupo Experimental Agua Destilada		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
<i>PQM</i>	4,61684	0,48206	4,84487	0,24731	0,2265
<i>1° IRRi</i>	0,01419	0,00675	0,01792	0,00413	0,1306
<i>2° IRRi</i>	0,00695	0,00312	0,00993	0,00056	0,0343

PQM: Preparación quimio-mecánica. **1°IRRI:** Primera irrigación intermedia. **2°IRRI:** Segunda irrigación intermedia. **DS:** Desviación estándar. **NaCl 0.9%:** Suero fisiológico. ***p*:** Significancia

Tabla N°12: Comparación de concentraciones de NaClO entre grupo NaCl 0.9% y Alcohol 70%, en las fases previas a la medicación de CHX al 2%.

Hipoclorito de Sodio (NaClO)

	Grupo Control NaCl 0,9%		Grupo Experimental Alcohol 70%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
<i>PQM</i>	4,61684	0,48206	4,89261	0,08713	0,0696
<i>1° IRRi</i>	0,01419	0,00675	0,01475	0,00354	0,7055
<i>2° IRRi</i>	0,00695	0,00312	0,00263	0,00018	0,0002

PQM: Preparación quimio-mecánica. **1°IRRI:** Primera irrigación intermedia. **2°IRRI:** Segunda irrigación intermedia. **DS:** Desviación estándar. **NaCl 0.9%:** Suero Fisiológico. ***p*:** Significancia

Tabla N°13: Comparación de concentraciones de NaClO entre grupo Agua destilada y Alcohol 70%, en las fases previas a la medicación de CHX al 2%

Hipoclorito de Sodio (NaClO)

	Grupo Control Agua destilada		Grupo Experimental Alcohol 70%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
<i>PQM</i>	4,84487	0,24731	4,89261	0,08713	0,7622
<i>1° IRRi</i>	0,01792	0,00413	0,01475	0,00354	0,1040
<i>2° IRRi</i>	0,00993	0,00056	0,00263	0,00018	0,0002

PQM: Preparación quimio-mecánica. **1°IRRI:** Primera irrigación intermedia. **2°IRRI:** Segunda irrigación intermedia. **DS:** Desviación estándar. ***p*:** Significancia

Se detectó una disminución en la concentración inicial de 5% de NaClO en la etapa de PQM entre el grupo control y los grupos experimentales. Posteriormente durante el primer uso de irrigantes intermedios, la concentración de NaClO disminuyó en los tres grupos, principalmente en el grupo control, seguido por el

Alcohol al 70%. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$).

Luego, durante la segunda irrigación intermedia, se observó una disminución en la concentración de NaClO estadísticamente significativa al comparar los distintos irrigantes, donde el Alcohol al 70% logró mejores resultados tanto al comparar los tres grupos entre sí, como al compararlo con el control y el agua destilada en forma independiente ($p < 0.05$).

8.2 Concentración de PCA:

Mediante la curva de calibración anteriormente definida (Quiroz y cols., 2015), en conjunto con los valores de absorbancia obtenidos por espectrofotometría luego de someter a las muestras expuestas a CHX al 2% al protocolo de identificación de PCA ya mencionado, se determinaron las concentraciones del compuesto en los distintos grupos de estudio, como se muestra en la **Tabla N°14**.

Tabla N°14: Concentraciones de PCA al aplicar CHX al 2% en los los 3 grupos de estudio: NaCl 0.9%, Agua Destilada, Alcohol 70%.

	[PCA] _{Máx}	[PCA] _{Mín}	Media	DS
Medicación CHX 2% NaCl 0.9%	0,00502	0,00116	0,00296	0,00131
Medicación CHX 2% Agua Destilada	0,00218	0,00121	0,00163	0,00036
Medicación CHX 2% Alcohol 70%	0,00351	0,00096	0,00229	0,00119

[PCA]_{Máx}: Concentración de PCA máxima. [PCA]_{Mín}: Concentración de PCA mínima. DS: Desviación estándar.

La comparación entre las concentraciones de PCA de los 3 grupos al evaluar la fase de medicación con CHX se muestra en **Tabla N°15**. Además, se efectuó la comparación entre los grupos de estudio por separado, alternando los grupos experimentales con el grupo control (**Tabla N°16 y Tabla N°17**) y comparando ambos grupos experimentales (**Tabla N°18**), para determinar diferencias

significativas entre cada irrigante y la formación de PCA. Los resultados fueron expuestos en el **Gráfico N°3**.

Tabla N°15: Comparación de concentraciones de PCA en los 3 grupos de estudio, luego de la medicación con CHX al 2%.

Paracloroanilina (PCA)

	Grupo Control NaCl 0,9%		Grupo Experimental Agua Destilada		Grupo Experimental Alcohol 70%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
<i>Medicación</i>	0,0029	0,0013	0,0016	0,0003	0,0022	0,0011	0,0945

DS: Desviación estándar. *p*: Significancia

Tabla N°16: Comparación de concentraciones de PCA entre el grupo de suero fisiológico (NaCl 0.9%) y Agua destilada al aplicar medicación de CHX al 2%.

	Grupo Control NaCl 0.9%		Grupo Experimental Agua destilada		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
Medicación	0,00296	0,00131	0,00163	0,00036	0,0494

DS: Desviación estándar. *p*: Significancia

Tabla N°17: Comparación de concentraciones de PCA entre el grupo de suero fisiológico (NaCl 0.9%) y Alcohol 70% al aplicar medicación de CHX al 2%.

	Grupo Control NaCl 0.9%		Grupo Experimental Alcohol 70%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
Medicación	0,00296	0,00131	0,00229	0,00119	0,0963

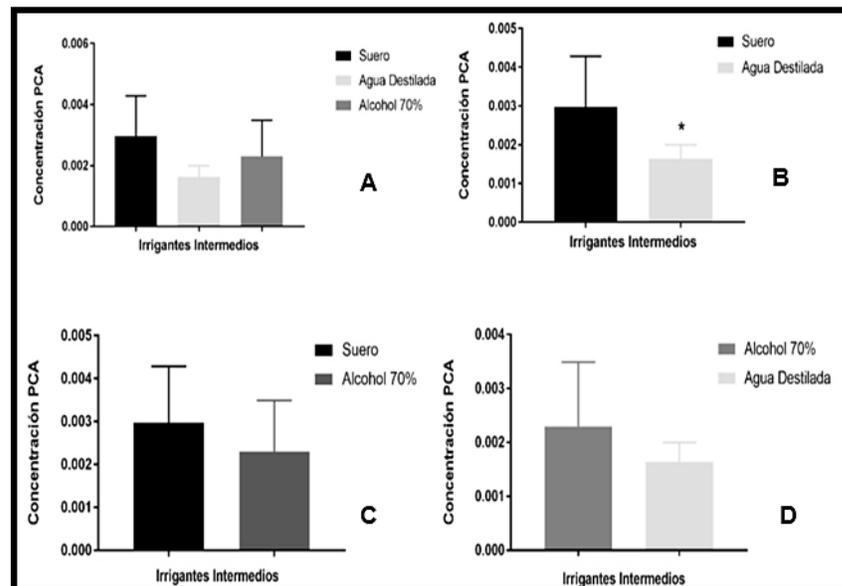
DS: Desviación estándar. *p*: Significancia

Tabla N°18: Comparación de concentraciones de PCA entre el grupo de Alcohol 70% y Agua destilada al aplicar medicación con CHX al 2%.

	Grupo Control Agua destilada		Grupo Experimental Alcohol 70%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
Medicación	0,00163	0,00036	0,00229	0,00119	0,5453

DS: Desviación estándar. *p*: Significancia

Gráfico N°3: Comparación de concentraciones de PCA según IRRi utilizado previo a medicación con CHX al 2%.

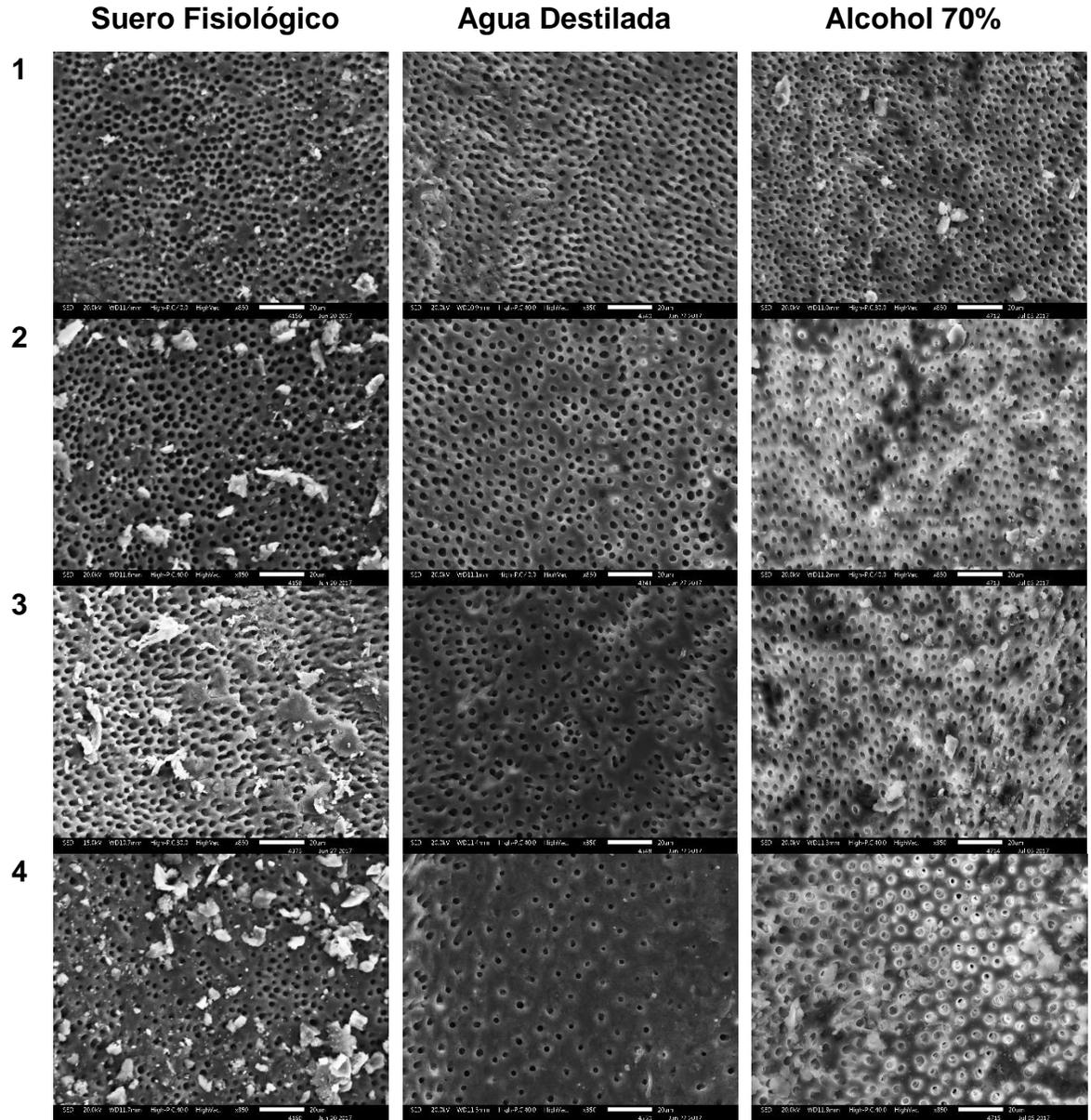


A: Comparación de concentraciones de PCA entre los 3 grupos de IRRi; **B:** Comparación de concentración de PCA entre grupo control (NaCl 0.9%) y Agua destilada; **C:** Comparación de concentración de PCA entre grupo control (NaCl 0.9%) y Alcohol 70% **D:** Comparación de concentración de PCA entre grupo Alcohol 70% y Agua destilada; (*): Valor $p < 0.05$

En la etapa de medicación con CHX al 2% se observó presencia de PCA en los tres grupos estudiados. Sin embargo, al momento de comparar los tres grupos no existieron diferencias estadísticamente significativas entre éstos ($p > 0,05$). Por otra parte, al comparar los diferentes grupos independientemente se observó que el grupo agua destilada mostró una concentración menor y estadísticamente significativa respecto del grupo control ($p < 0,05$).

8.3 Grado de Obliteración de Túbulos dentinarios:

Utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB) se obtuvieron imágenes de distintas áreas del canal radicular, donde se observaron diferencias en el grado de obliteración de los túbulos dentinarios respecto de cada grupo de estudio, como se observa en la **Figura N°20**. Además, se realizó un análisis elemental EDS de las muestras estudiadas (**Figura N°21**).



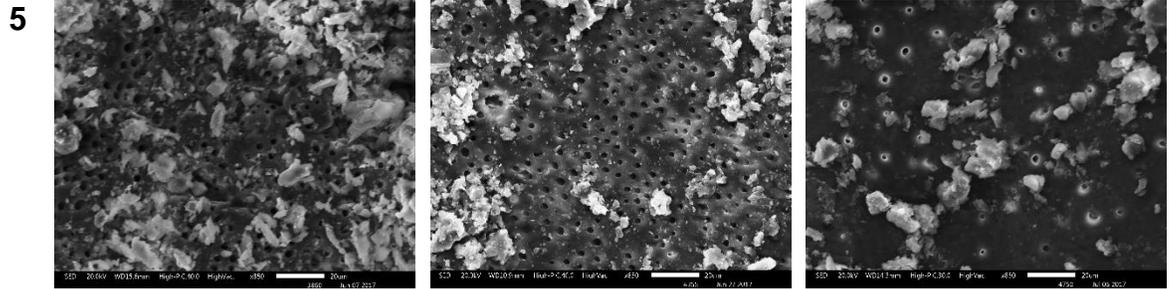


Figura N°20: Microfotografías: Áreas seleccionadas al dividir longitudinalmente el canal dentinario de cada muestra de estudio en 5 partes. Las imágenes fueron ordenadas de cervical (1) a apical (5).

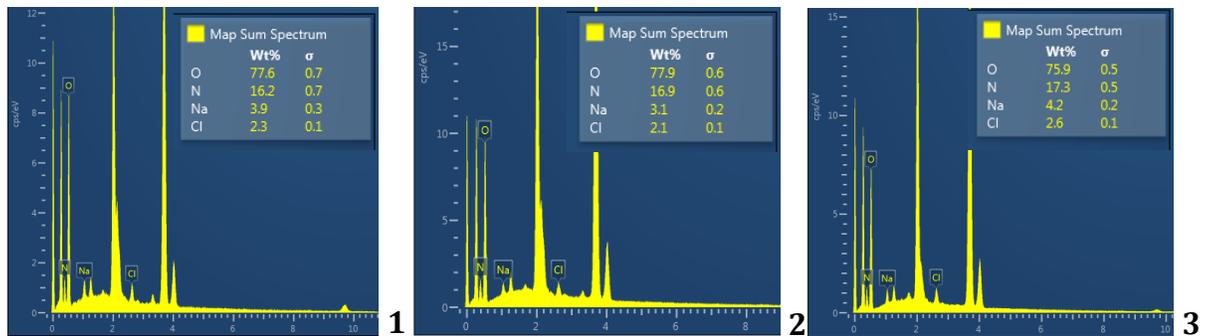


Figura N°21: Análisis elemental EDS según grupo de estudio. (1) Suero Fisiológico; (2) Agua Destilada; (3) Alcohol 70%.

Se observa que existen diferencias visibles en la microestructura de las paredes del canal radicular, respecto al grado de obliteración de los túbulos dentinarios como se observa en la **Figura N°**. Además, al realizar el análisis elemental (EDS) de las distintas secciones de las muestras se observó la presencia de cloro (Cl) en las paredes tratadas de las muestras dentarias (**Figura N°21**).

Por otra parte, mediante el uso de MEB se realizó el análisis y conteo de los túbulos dentinarios de las diferentes secciones del canal radicular, agrupándolos según el grado de obliteración en los 3 grupos de estudio (**Tabla N°19**). Se comparó además las diferencias en los grados de obliteración relacionando los grupos experimentales (Alcohol 70% y Agua Destilada) con el grupo control (NaCl 0,9%)

(Tabla N°20 y Tabla N°21) y los grupos experimentales entre sí (Tabla N°22). Los resultados fueron expuestos en el **Gráfico N°4**.

Tabla N°19: Comparación de grados de obliteración de los túbulos dentinarios en los 3 grupos de estudio con diferentes IRRi.

Grado de Obliteración de los túbulos dentinarios

	Grupo Control NaCl 0,9%		Grupo Experimental Agua Destilada		Grupo Experimental Alcohol 70%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
TO	20,1	14,52	5,34	4,34	20,02	16,27	0,0001
PO	9,83	7,23	5,57	5,44	12,43	9,09	0,0001
NO	179,78	106,73	292,25	130,56	216,59	127,50	0,0001

TO: Totalmente obliterado, PO: Parcialmente obliterado, NO: No obliterado, DS: Desviación estándar, *p*: Significancia.

Tabla N°20: Comparación de grados de obliteración de túbulos dentinarios entre grupo control y Agua Destilada.

	Grupo Control NaCl 0,9%		Grupo Experimental Agua Destilada		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
TO	20,1	14,52	5,34	4,34	0,0001
PO	9,83	7,23	5,57	5,44	0,0001
NO	179,78	106,73	292,25	130,56	0,0001

TO: Totalmente obliterado, PO: Parcialmente obliterado, NO: No obliterado, DS: Desviación estándar, *p*: Significancia.

Tabla N°21: Comparación de grados de obliteración de túbulos dentinarios entre grupo control y Alcohol 70%.

	Grupo Control NaCl 0,9%		Grupo Experimental Alcohol 70%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
TO	20,1	14,52	20,02	16,27	0,4944
PO	9,83	7,23	12,43	9,09	0,0499
NO	179,78	106,73	216,59	127,50	0,0466

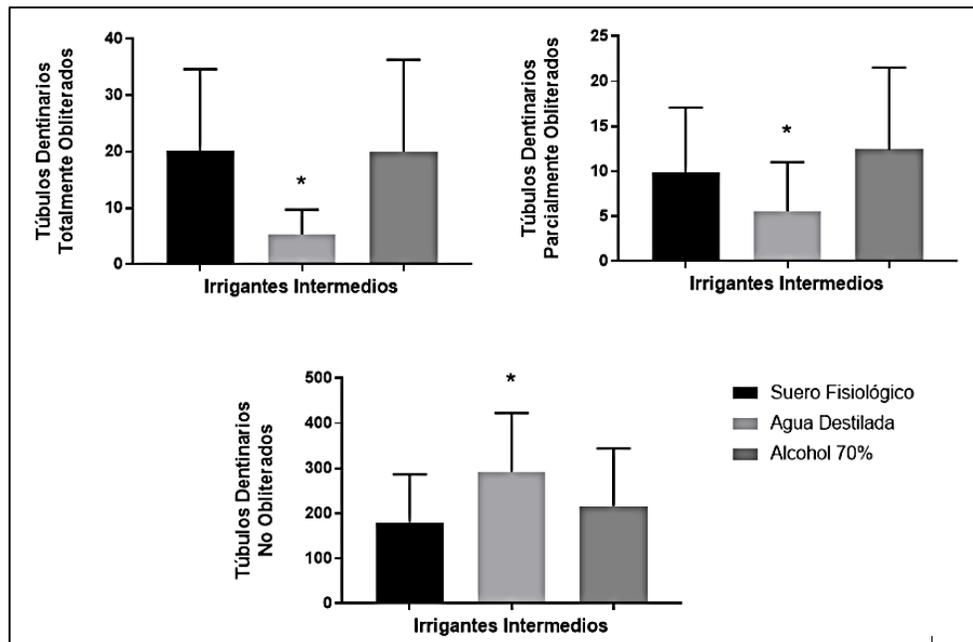
TO: Totalmente obliterado, PO: Parcialmente obliterado, NO: No obliterado, DS: Desviación estándar, *p*: Significancia.

Tabla N°22: Comparación de grados de obliteración de túbulos dentinarios entre grupos experimentales.

	Grupo Control Agua destilada		Grupo Experimental Alcohol 70%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
TO	5,34	4,34	20,02	16,27	0,0001
PO	5,57	5,44	12,43	9,09	0,0001
NO	292,25	130,56	216,59	127,50	0,0001

TO: Totalmente obliterado, **PO:** Parcialmente obliterado, **NO:** No obliterado, **DS:** Desviación estándar, **p:** Significancia.

Gráfico N°4: Comparación de los grados de obliteración de los túbulos dentinarios entre los 3 grupos de estudio según irrigante utilizado.



(*): Valor $p < 0,05$

De los resultados obtenidos del recuento tubular en MEB, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al comparar la cantidad de túbulos completamente obliterados, parcialmente obliterados y no obliterados al interior de las paredes del canal dentinario. Al comparar los tres grupos de irrigantes intermedios, el grupo experimental de agua destilada presentó la menor cantidad de túbulos total o parcialmente ocluidos, además de la mayor cantidad de túbulos no obliterados ($p < 0,05$).

9. DISCUSIÓN

Uno de los recursos terapéuticos más eficientes y fundamentales durante el tratamiento endodóntico es el uso de diversos agentes químicos en una combinación y secuencia específica para el control de la infección y el manejo de residuos orgánicos e inorgánicos presentes en la complejidad del SCR.

El NaClO en distintas concentraciones es el irrigante más utilizado en endodoncia (Serper y cols., 2004) pero por sí solo no cumple con los requerimientos de un irrigante ideal (Haapasalo y cols, 2010). Es por esto, que se ha propuesto la utilización de un protocolo de irrigación que incluya al NaClO para disolver el contenido orgánico del canal, EDTA para eliminar el componente inorgánico del barro dentinario generado durante la instrumentación mecánica y agentes antisépticos como CHX para aumentar el espectro antimicrobiano y optimizar la desinfección del canal ya preparado debido a la sustantividad que presenta esta sustancia (Zehnder, 2006).

Este estudio se centró en la premisa de que durante la terapia endodóntica al combinar distintos irrigantes y medicamentos se pueden generar interacciones que resultan en la formación de subproductos al interior del canal dentinario que pueden afectar los resultados del tratamiento (Basrani y cols, 2007, 2012).

Según Prado y cols. (2013), a pesar de que distintas sustancias como EDTA, AC o ácido fosfórico han sido propuestas para eliminar los residuos inorgánicos producidos durante la PQM, los productos de la interacción química al interior del SCR forman precipitados en forma de “barro dentinario químico” sobre la superficie dentinaria, ocluyendo la estructura tubular. Vivacqua-Gomes (2002) en un estudio *ex vivo* realizado sobre 50 dientes unirradiculares observó que este tipo de capa química sobre las paredes del canal interfiere con la correcta adaptación de los materiales de relleno y sellado endodóntico durante la obturación del canal radicular (OCR).

La combinación de NaClO y CHX en distintas concentraciones genera una reacción ácido-base que produce como resultado la formación de una sal como subproducto en forma de precipitado insoluble, que en diversos estudios ha

mostrado la presencia de Paracloroanilina (PCA) (Basrani y cols., 2007; Bui y cols., 2008). La PCA ha demostrado ser un compuesto potencialmente maligno según la IACR (2015) y estudios toxicológicos en animales establecieron efectos nocivos para la salud cuando se somete a una exposición reiterada (OMS, 2003).

En términos clínicos la formación de PCA puede provocar cambios en el color de la estructura dentaria, disminuir el efecto de la medicación intracanal, además de ser un compuesto citotóxico para tejidos periapicales (Bui y cols., 2008, Akisuey cols., 2010). Un estudio *in vitro* realizado por Riquelme y cols., (2015), mostró que la formación de PCA está directamente relacionada con la concentración de NaClO presente al momento de reaccionar con CHX al 2%.

Valera y cols. (2010), evaluaron la microfiltración marginal evaluada en canales instrumentados y sometidos a diferentes protocolos de irrigación confirmando que en aquellos dientes donde se utilizó NaClO en asociación exclusiva con CHX, tenían los peores resultados en términos de microfiltración y obliteración de la estructura tubular, incluso al comparar los resultados con la irrigación única con agua destilada.

En el meta-análisis realizado por Shahravan y cols., (2007) se concluyó que la remoción del barro dentinario mejora el sellado del sistema de canales radiculares en forma significativa, mientras que el tipo de técnica de obturación o el cemento sellador no producían el mismo impacto significativo.

Diversos autores proponen el uso de irrigantes intermedios en grandes volúmenes previo a la medicación con CHX con el fin disminuir la concentración de NaClO al interior del canal y así, disminuir la formación de subproductos como PCA mejorando la limpieza y permeabilidad al interior del SCR (Krishnamurthy y Sudhakaran, 2010; Gasic y cols., 2012; Riquelme y cols., 2015).

El protocolo de irrigación endodóntica utilizado en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile actualmente propone el uso de suero fisiológico (NaCl 0,9%) como irrigante intermedio entre NaClO y la medicación con CHX al 2%, por lo que en el presente estudio se estableció el uso de esta solución salina a modo de grupo control. Sin embargo, Alegre y cols. (2017) al replicar este

protocolo de irrigación y medicación en un estudio *ex vivo*, demostró que aunque se logró una dilución de los agentes químicos utilizados, la formación de PCA fue detectable en las fases finales del tratamiento.

En el presente estudio se analizó *ex vivo* la influencia de distintos irrigantes, suero fisiológico (control), agua destilada (AD) y alcohol al 70% (OH70%), en la formación de PCA y en el grado de obliteración de los túbulos dentinarios al utilizarlos como irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y la medicación con CHX al 2%. Debido a que los resultados varían entre los tres grupos estudiados se confirma la hipótesis planteada para esta investigación, estableciendo diferencias entre los resultados del grupo control y los grupos experimentales.

En relación a las concentraciones de NaClO, se observó que a partir de la concentración inicial del 5% de NaClO, hubo una leve disminución en la etapa inicial (Cavidad de acceso, parte de la PQM), en el rango de 4,62% a 4,82%. Asimismo, durante la 1°IRRI también se observa un decrecimiento en la concentración de NaClO de entre 0,014% a 0,017%, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ($p>0,05$). Por otra parte, las diferencias entre las concentraciones al final de la 2°IRRI entre los tres grupos fue significativa ($p<0,05$), donde el Alcohol al 70% logró menores concentraciones respecto del grupo control y agua destilada (OH70%: 0,002%; NaCl 0,9%: 0,006%; AD: 0,009%). Estos resultados son similares a los descritos por Farías (2017), Quiroz (2015) y Reyes (2015).

Según Krishnamurthy y Sudhakaran (2010), grandes volúmenes de irrigantes intermedios entre NaClO y CHX 2% similares a los utilizados en este estudio (3ml en cada fase del tratamiento), pueden evitar la formación de PCA. No obstante, pese a que existe una disminución en la concentración de NaClO, no se logra diluir por completo, dejando contenido residual al interior del SCR para interactuar con la CHX al 2%.

La formación de PCA se observó en los tres grupos de estudio, pero la menor concentración se obtuvo en el grupo de AD a pesar de las diferencias en la concentración de NaClO residual. Pese a las variaciones entre los distintos IRRI

(NaCl 0,9%: 0,0029%; OH70%: 0,0022 y AD: 0,0016) no hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar los tres grupos entre sí ($p > 0,05$). Sin embargo, al correlacionar los grupos experimentales con el control de forma independiente, el AD mostró una disminución significativa en la formación de PCA respecto del control NaCl 0,9% ($p < 0,05$), lo que se condice con los resultados obtenidos por Quiroz (2015) y Prado y cols. (2013).

Estudios *in vitro* como los realizados por Riquelme y cols. (2015), han mostrado que al diluir NaClO en agua destilada incluso a concentraciones de 0,0025%, se produce de igual manera formación de PCA (aunque en menor concentración) al momento de interaccionar con la CHX 2%. Estos resultados son concordantes con lo observado en este trabajo, donde la formación de PCA ocurre sin mayores diferencias al comparar los distintos Irrigantes intermedios. Sin embargo, al asumir que la cantidad de PCA remanente en el canal es del orden de los 0,1ml (100 μ l), con el potencial de ingresar al organismo del hospedero, el nivel de exposición sería menor a 2 μ g en total, por lo que el paciente sometido a la terapia endodóntica utilizando este protocolo de irrigación y medicación, no presentaría riesgo toxicológico ante la exposición a PCA.

Si observamos el grado de obliteración de los túbulos dentinarios en distintas secciones del canal radicular de los dientes analizados en este estudio, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos analizados. Al observar y cuantificar el grado de obliteración de túbulos (totalmente obliterados y parcialmente obliterados) se encontró el menor grado en el grupo de AD, seguido del OH70% y finalmente el grupo control de NaCl 0,9% ($p < 0,0001$). Asimismo, el grupo de AD resultó presentar la mayor cantidad de túbulos dentinarios no obliterados, con diferencias estadísticamente significativas con los otros grupos ($p < 0,0001$).

Respecto de la obliteración tubular, se infiere que el agua destilada como irrigante intermedio presenta una relación positiva en cuanto al grado de permeabilidad dentinaria, concordante con los bajos niveles de PCA presentados.

El bajo grado de obliteración tubular que se produjo en las muestras donde se utilizó agua destilada concuerda con los bajos niveles de PCA encontrados al utilizar este irrigante intermedio. Por otra parte, los resultados observados en el grupo control podrían explicarse por una reacción producida entre el suero fisiológico con los distintos agentes químicos utilizados en el protocolo de irrigación y medicación. Prado y cols. (2013), observaron en un estudio *ex vivo* que la solución salina de NaCl 0,9% al interaccionar con CHX produce un precipitado que se deposita sobre los túbulos dentinarios interfiriendo con el correcto sellado tridimensional de las estructuras y dicho precipitado no se observa al utilizar agua destilada. Asimismo, Riquelme y cols. (2015) determinaron *in vitro* que el suero fisiológico al contacto con CHX forma un precipitado salino de color blanco capaz de depositarse en la superficie de la estructura tubular del canal dentinario.

En el estudio realizado por Krishnamurthy y Sudhakaran (2010) se observó que el uso de alcohol isopropílico al 100% puede evitar la formación de precipitados cuando es utilizado entre CHX al 2% y NaClO al 2,5%, no detectando cloro o anilina con el método empleado en aquel estudio. En nuestro estudio no se observaron precipitados visibles en ningún diente, aunque sí un número menor de túbulos dentinarios obliterados en la observación bajo SEM. Ninguno de los irrigantes intermedios, incluido el alcohol, evitó completamente la formación de PCA en solución, lo que puede deberse a la mayor concentración de NaClO utilizada (NaClO 5%), al protocolo de irrigación aplicado y a las diferencias en el método de detección y cuantificación de PCA.

Reyes (2015), en su planteamiento metodológico, describió alteraciones *in vitro* en el espectro de absorción de NaClO al mezclar diferentes diluciones acuosas de este compuesto (0,0005% a 5%) con alcohol absoluto, planteando una posible interacción entre ambos que no dejaría NaClO libre para reaccionar con CHX al 2%. En nuestro estudio la segunda irrigación con OH70% redujo significativamente la concentración de NaClO residual en solución (previo a la medicación con CHX 2%) en comparación a los otros irrigantes intermedios. Sin embargo, aunque el OH70% disminuye la concentración de PCA, la concentración de NaClO residual no fue suficiente para generar una diferencia significativa en la concentración de

PCA con los otros grupos estudiados ($p>0,05$). Finalmente, es importante considerar que el uso de alcohol en distintas concentraciones como irrigante intermedio aún no está completamente dilucidado y se necesitan más estudios *in vivo* que analicen sus efectos sobre los tejidos periapicales.

En este estudio se observó que al utilizar agua destilada como irrigante intermedio se produce el menor grado de obliteración de los túbulos dentinarios y la menor concentración de PCA en comparación con el grupo control (suero fisiológico).

La permeabilidad de las paredes del canal radicular resulta relevante para el resultado del tratamiento endodóntico. Khayat y cols. (2005), establecieron que una mayor remoción del barro dentinario, dejando una mayor permeabilidad en las paredes del canal, tiene un efecto significativo en la disminución de la microfiltración en canales obturados con cementos en base a eugenato de zinc (Roth 801) y resina (AH26). Homayouni y cols. (2014) describieron que la presencia del precipitado formado por la interacción de CHX con PCA afecta la capacidad de sellado del canal cuando se utiliza gutapercha y cementos a base de resina como AH26. Establecen que es necesario evitar la formación de este precipitado utilizando irrigantes intermedios que contrarresten dicha interacción. Asimismo, Valera y cols. (2010), describen que la interacción de CHX con NaClO produce un precipitado que se adhiere firmemente a las paredes del canal, siendo difícil de eliminar, por lo que es necesario evitar su formación para que no produzca efectos similares al barro dentinario.

Finalmente, cabe destacar que a pesar de que no se logra evitar completamente la formación de PCA al interior del SCR, existen diferencias significativas entre los distintos grupos y el grado de obliteración de los túbulos dentinarios también difiere significativamente dependiendo del irrigante intermedio utilizado. Se sugieren estudios *in vivo* para determinar la influencia de contaminación microbiana y exudado intracanal en la efectividad de dichos irrigantes.

Se recomienda además realizar estudios adicionales que analicen la composición de la capa química generada por la interacción de los distintos irrigantes y medicamentos utilizados en el protocolo endodóntico y cómo ésta afecta la adhesión de los materiales de sellado del canal radicular.

10. CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo de investigación se puede concluir que:

1. La utilización de Suero Fisiológico, Agua Destilada y Alcohol al 70% como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y la medicación con CHX al 2% no impide la formación de PCA en las soluciones, pero sí disminuye su concentración.
2. No existen diferencias significativas en la formación de PCA en las soluciones al comparar simultáneamente el uso de Suero Fisiológico, Agua Destilada y Alcohol al 70% como IRRi entre NaClO 5% y la medicación con CHX 2%.
3. El agua destilada usada como irrigante intermedio es más eficaz que el suero fisiológico en prevenir la formación de PCA.
4. El grado de obliteración de los túbulos dentinarios es menor al utilizar agua destilada como IRRi que al utilizar suero fisiológico.
5. El agua destilada como IRRi permite un mayor grado de túbulos dentinarios no obliterados respecto del alcohol al 70%.
6. El suero fisiológico usado como IRRi deja la mayor cantidad de túbulos dentinarios obliterados en comparación con alcohol al 70% y agua destilada.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akisue, E., Tomita, V. S., Gavini, G., & de Figueiredo, J. A. P. (2010). Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *Journal of endodontics*, 36(5), 847-850.
- Alegre O, Yévenes I, Parada J, Maggiolo S, Fernández E. (2017) Determination of residual parachloroaniline produced by endodontic treatment after the use of 5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine combined: an ex-vivo study. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil Oral*. 10(3); 93-96.
- Barbin, L. E., Estrela, C., Guedes, D. F. C., Spanó, J. C. E., Sousa-Neto, M. D., & Pécora, J. D. (2013). Detection of para-chloroaniline, reactive oxygen species, and 1-chloro-4-nitrobenzene in high concentrations of chlorhexidine and in a mixture of chlorhexidine and calcium hydroxide. *Journal of endodontics*, 39(5), 664-668.
- Basrani, B. (2005). Chlorhexidine gluconate. *Australian Endodontic Journal*, 31(2), 48-52.
- Basrani, B. R., Manek, S., Sodhi, R. N., Fillery, E., & Manzur, A. (2007). Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Journal of endodontics*, 33(8), 966-969.
- Basrani, B., & Haapasalo, M. (2012). Update on endodontic irrigating solutions. *Endodontic topics*, 27(1), 74-102.
- Basrani, B., Tjäderhane, L., Santos, J. M., Pascon, E., Grad, H., Lawrence, H. P., & Friedman, S. (2003). Efficacy of chlorhexidine-and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 96(5), 618-624.
- Baumgartner JC, Ibay AC (1987). The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod* 13(2): 47-51 50
- Berber, V. B., Gomes, B. P. F. A., Sena, N. T., Vianna, M. E., Ferraz, C. C. R., Zaia, A. A., & Souza-Filho, F. J. (2006). Efficacy of various concentrations of NaOCl and

instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *International endodontic journal*, 39(1), 10-17.

Bilbao M, Maggiolo S, Neira M, Yévenes I. (2017) Saline Solution in the Formation of Para-Chloroaniline in the Reaction Between Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite. *EC Dental Science* 8 (6): 219-226.

Boehncke, A., Kielhorn, J., Könnecker, G., Pohlenz-Michel, C., & Mangelsdorf, I. (2003). 4-Chloroaniline. Concise International Chemical Assessment Document; 48. *World Health Organization*.

Boehncke, A., Kielhorn, J., Konnecker, G., Pohlenz-Michel, C., Mangelsdorf, I., & World Health Organization. (2003). 4-Chloroaniline.

Bui, T. B., Baumgartner, J. C., & Mitchell, J. C. (2008). Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *Journal of Endodontics*, 34(2), 181-185.

Bystrom A, Sundqvist G (1981) Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89:31-8.

Calt, S., & Serper, A. (2002). Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *Journal of endodontics*, 28(1), 17-19.

Crumpton, B. J., Goodell, G. G., & McClanahan, S. B. (2005). Effects on smear layer and debris removal with varying volumes of 17% REDTA after rotary instrumentation. *Journal of endodontics*, 31(7), 536-538.

Darcey, J., Jawad, S., Taylor, C., Roudsari, R. V., & Hunter, M. (2016). Modern Endodontic Principles Part 4: Irrigation. *Dental update*, 43(1), 20-2.

Davies, A. (1973). The mode of action of chlorhexidine. *Journal of Periodontal research*, 8(s12), 68-75.

Denton, G. W. (1991). Chlorhexidine. *Disinfection, sterilization and preservation*. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 274-289.

Estrela, C. (2005). *Ciência endodôntica*. Artes Médicas.

Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A., & Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal*, 13(2), 113-117.

Farías Salinas, C. (2017). Efecto del alcohol absoluto en la formación de paracloroanilina en el tratamiento endodóntico : Estudio ex vivo. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/146868>

Farmacopea Europea (2005). 5ª Edición. Monografías C. Clorhexidina, digluconato de disolución de [p.-1997; m.-3.0], 1215.

Fedorowicz, Z., Nasser, M., Sequeira-Byron, P., de Souza, R. F., Carter, B., & Heft, M. (2012). Irrigants for non-surgical root canal treatment in mature permanent teeth. *status and date: New, published in*, (9).

Foster, K. H., Kulild, J. C., & Weller, R. N. (1993). Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. *Journal of endodontics*, 19(3), 136-140.

Gasic, J., Popovic, J., Živković, S., Petrovic, A., Barac, R., & Nikolic, M. (2012). Ultrastructural analysis of the root canal walls after simultaneous irrigation of different sodium hypochlorite concentration and 0.2% chlorhexidine gluconate. *Microscopy research and technique*, 75(8), 1099-1103.

Gatewood, R. S. (2007). Endodontic materials. *Dental Clinics*, 51(3), 695-712.

Gomes, B. P. F. A., Ferraz, C. C. R., ME, V., Berber, V. B., Teixeira, F. B., & Souza-Filho, F. J. (2001). In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International endodontic journal*, 34(6), 424-428.

Gomes, B. P., Vianna, M. E., Zaia, A. A., Almeida, J. F. A., Souza-Filho, F. J., & Ferraz, C. C. (2013). Chlorhexidine in endodontics. *Brazilian Dental Journal*, 24(2), 89-102.

Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M (2003). Interactions of ethylenediaminetetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J*. 36:411–7

Greenstein, G., Berman, C., & Jaffin, R. (1986). Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology*, 57(6), 370-377.

Haapasalo M, Qian W, Shen Y (2012). Irrigation: Beyond the smear layer. *Endodontic* 27:35-53.

Haapasalo, H. K., Siren, E. K., Waltimo, T. M. T., Orstavik, D., & Haapasalo, M. P. P. (2000). Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *International Endodontic Journal*, 33(2), 126-131.

Haapasalo, M., Shen, Y., Qian, W., & Gao, Y. (2010). Irrigation in endodontics. *Dental Clinics of North America*, 54(2), 291-312.

Homayouni, H., Majd, N. M., Zohrehei, H., Mosavari, B., Adel, M., Dajmar, R., & Homayouni, A. (2014). The effect of root canal irrigation with combination of sodium hypo-chlorite and chlorhexidine gluconate on the sealing ability of obturation materials. *The open dentistry journal*, 8, 184.

Hülsmann, M., Heckendorff, M., & Lennon, A. (2003). Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *International endodontic journal*, 36(12), 810-830.

Jiménez-Chaves, V., Labarta, A. B., Gualtieri, A., & Sierra, L. G. (2013). Evaluación De La Remoción Del Barro Dentinario Al Utilizar Ácido Cítrico Al 10% Y Rc-Prep Como Soluciones Irrigantes Estudio Con Microscopio Electrónico De Barrido. *Revista Científica Odontológica*, 9(1).

Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A (2006). Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Australian Endodontic Journal*. 32:112–5.

Khayat, A., & Jahanbin, A. (2005). The influence of smear layer on coronal leakage of Roth 801 and AH26 root canal sealers. *Australian Endodontic Journal*, 31(2), 66-68.

Krishnamurthy, S., & Sudhakaran, S. (2010). Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Journal of endodontics*, 36(7), 1154-1157.

- Ma, J., Wang, Z., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2011). A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *Journal of endodontics*, 37(10), 1380-1385.
- Mehra, P., CLANCY, C., & WU, J. (2000). Formation of a facial hematoma during endodontic therapy. *The Journal of the American Dental Association*, 131(1), 67-71.
- Mohammadi, Z., & Abbott, P. V. (2009). The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International endodontic journal*, 42(4), 288-302.
- Mortenson, D., Sadilek, M., Flake, N. M., Paranjpe, A., Heling, I., Johnson, J. D., & Cohenca, N. (2012). The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. *International endodontic journal*, 45(9), 878-882.
- Naenni, N., Thoma, K., & Zehnder, M. (2004). Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *Journal of endodontics*, 30(11), 785-787.
- Niu, W., Yoshioka, T., Kobayashi, C., & Suda, H. (2002). A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *International Endodontic Journal*, 35(11), 934-939.
- Paquette, L., Legner, M., Fillery, E. D., & Friedman, S. (2007). Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. *Journal of endodontics*, 33(7), 788-795.
- Pashley, D. H. (1985). Dentin-Predentin Complex and Its Permeability: Physiologic Overview. *Journal of Dental Research*, 64(4), 613-620.
- Pecora JD, Sousa-Neto MD, Estrela C. (1999) Soluções irrigadoras auxiliares do preparo do canal radicular. In: Endodontia - Princípios biológicos e mecânicos. Estrela C, Figueiredo JAP. Eds. São Paulo: Artes Médicas; 552-569.
- Peters, O. A., Laib, A., Göhring, T. N., & Barbakow, F. (2001). Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *Journal of Endodontics*, 27(1), 1-6.

Prado, M., Júnior, H. M. S., Rezende, C. M., Pinto, A. C., Faria, R. B., Simão, R. A., & Gomes, B. P. (2013). Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *Journal of endodontics*, 39(4), 505-510.

Qian, W., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2011). Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *Journal of endodontics*, 37(10), 1437-1441.

Quiroz Dickson, G. (2015). Efectividad del agua destilada usada como irrigante intermedio entre hipoclorito de sodio 5% y clorhexidina 2% para prevenir la formación de paracloroanilina dentro del sistema de canales radiculares, estudio ex vivo. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/137657>

Radcliffe, C. E., Potouridou, L., Qureshi, R., Hababbeh, N., Qualtrough, A., Worthington, H., & Drucker, D. B. (2004). Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, 37(7), 438-446.

Rasimick, B. J., Nekich, M., Hladek, M. M., Musikant, B. L., & Deutsch, A. S. (2008). Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *Journal of Endodontics*, 34(12), 1521-1523.

Reyes Roldán, M. (2015). Rol del alcohol 70% en la formación de paracloroanilina Ex vivo en tratamiento endodóntico tras ser utilizado como irrigante intermedio entre hipoclorito de sodio 5% y clorhexidina 2%. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/141559>

Riquelme, M. J., Correa, V., Araya, P., Neira, M., & Yévenes, I. (2015). Water and Physiological Saline to Prevent the Formation of P-Chloroaniline.

Rosenthal, S., Spångberg, L., & Safavi, K. (2004). Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 98(4), 488-492.

Seidberg, B. H., & Schilder, H. (1974). An evaluation of EDTA in endodontics. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 37(4), 609-620.

- Şen, B. H., Ertürk, Ö., & Pişkin, B. (2009). The effect of different concentrations of EDTA on instrumented root canal walls. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 108(4), 622-627.
- Şen, B. H., Wesselink, P. R., & Türkün, M. (1995). The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. *International Endodontic Journal*, 28(3), 141-148.
- Serper, A., Özbek, M., & Çalt, S. (2004). Accidental sodium hypochlorite-induced skin injury during endodontic treatment. *Journal of endodontics*, 30(3), 180-181.
- Shahravan, A., Haghdoost, A. A., Adl, A., Rahimi, H., & Shadifar, F. (2007). Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. *Journal of endodontics*, 33(2), 96-105.
- Siqueira, J. F., Rôças, I. N., Favieri, A., & Lima, K. C. (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 26(6), 331-334.
- Stojicic, S., Zivkovic, S., Qian, W., Zhang, H., & Haapasalo, M. (2010). Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *Journal of endodontics*, 36(9), 1558-1562.
- Ventura Paredes, J. M. (2016). Eficiencia de soluciones irrigadoras sobre la permeabilidad dentinaria del canal radicular in vitro.
- Vivacqua-Gomes, N., Ferraz, C. C. R., Gomes, B. P. F. A., Zaia, A. A., Teixeira, F. B., & Souza-Filho, F. J. (2002). Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *International Endodontic Journal*, 35(9), 791-795.
- World Health Organization, 2006. IARC monography on the evaluation of carcinogenic risks to human. *International Agency for Research on cancer*. Lyon, France 86, 1–25
- Zehnder, M. (2006). Root canal irrigants. *Journal of endodontics*, 32(5), 389-398.

12. ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO DE IRRIGACIÓN

1. Cavidad de acceso: Se realizó la cavidad de acceso endodóntico con piedra de alta velocidad (0.12, 0,14, 0.16) de acuerdo al tamaño de la cámara pulpar del diente, en esmalte dentario refrigerando hasta llegar a dentina. En dentina se cortó con fresas de carburo-tungsteno redondas de baja velocidad de acuerdo a la anatomía del diente hasta realizar la comunicación con la cámara pulpar. Una vez que se comunica se irriga con NaClO al 5% con *Jeringa Irrigación Monoject 3ml + Aguja (27x1 1/4)*. Se continuó con el destechamiento de la cámara pulpar, con con fresa Endo-Z o piedra tipo Llama de baja velocidad recorriendo el contorno del techo de la cámara pulpar. Una vez finalizado el destechamiento, se realizará el cateterismo con una lima K fina N° 10 o 15 graduada a dos tercios de la longitud aparente del diente medida en la radiografía previa, irrigando durante todo el procedimiento con NaClO al 5%. → **Recolección N° 1**
Posteriormente, se realizarán los desgastes compensatorios que en dientes anteriores corresponden al bisel incisal y desgaste de la convexidad palatina y en premolares, abordan las vertientes internas de las cúspides vestibular y palatina, con una piedra tipo llama o fresa Endo-Z de baja velocidad.
2. Preparación de los tercios cervical y medio (Flare): Con fresas Gates-Glidden. La secuencia utilizada se elige de acuerdo al calibre del canal en los tercios cervical y medio. Las fresas deben graduarse a los dos tercios de la longitud aparente del diente medido en la radiografía previa.
La secuencia para canales amplios será 3-2-1, para canales medios será 1-2-1 y para canales finos será un pre-flare con limas manuales y posteriormente la secuencia 1-2-1 irrigando con NaClO al 5%. → **Recolección N° 2**

3. Determinación Longitud de Trabajo (LT): Se realizará introduciendo la lima hasta que se visualice la punta de ésta a través del foramen apical. Se dejará la punta de la lima al ras del foramen y esa longitud se definirá como la longitud real del diente (LRD). La longitud de trabajo (LT) será definida a - 1mm de la LRD.
4. Preparación 1/3 Apical hasta Lima Maestra (LM) irrigando con NaClO al 5 % entre cada paso de lima. → **Recolección N° 3**
5. Retroceso (Step-Back) desde la LM hasta alcanzar el diámetro de la última fresa Gates Glidden utilizada al realizar el flare (en la mayoría de los casos coincide con la fresa Gates Glidden #1 diámetro #50). Con esto se consigue unir la instrumentación del tercio apical con la preparación de los tercios cervical y medio del canal (Técnica Corono-Apico-Medial). Se irrigará con NaClO al 5 % entre cada paso de lima. → **Recolección N°4**
6. Secado del canal radicular con conos de papel.
7. Irrigación (IRR) con suero fisiológico. Irrigar con 3 jeringas de 3 ml cada una. → **Recolección N° 5, 6 y 7**
8. Secado del canal radicular con conos de papel.
9. IRR con 1ml de EDTA al 10% durante 1 minuto. → **Recolección N° 8**
10. Secado del canal radicular con conos de papel.
11. IRR con suero fisiológico. Irrigar con 3 jeringas de 3 ml cada una. → **Recolección N° 9, 10 y 11**
12. Secado del canal radicular con conos de papel.

13. IRR Final y medicación con CHX al 2%. Irrigar y medicar con 1 jeringa de 3 ml.
 - ➔ Recolección N° 12

ANEXO 2

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TOMA DE MUESTRAS DENTARIAS PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“Análisis microscópico y químico de la interacción entre Hipoclorito de Sodio 5% y Clorhexidina 2% sobre las paredes del canal radicular al utilizar distintos irrigantes intermedios. Estudio *ex vivo*”

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar, o no, en una investigación médica.

Diego Cruz Lathrop, alumno de Odontología que realiza su Tesis de Pregrado en el Departamento de Odontología Conservadora de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, bajo la tutoría de la Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz, está realizando un estudio cuyo objetivo es medir los volúmenes de fluidos recogidos durante el tratamiento endodóntico en dientes extraídos para luego determinar el volumen y concentración del compuesto formado entre Hipoclorito de Sodio 5% y Clorhexidina 2%.

Todos los datos relacionados con su persona e información personal serán guardados de forma confidencial. Las muestras serán almacenadas indefinidamente, con un código, hasta su utilización en el laboratorio para el fin anteriormente explicado y se utilizarán únicamente para el propósito de esta investigación.

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria, sin que su decisión afecte la calidad de la atención médica que le preste nuestra institución. Usted no se beneficiará económicamente por participar en esta investigación y el estudio no tendrá costos para usted.

Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su identidad e información personal no será divulgada.

Si usted desea conocer los resultados de los análisis, deberá preguntarle al alumno responsable (Nombre: Diego Cruz Lathrop; Celular: 90372659)

He leído lo anteriormente descrito, se me ha explicado el propósito de esta investigación médica y mis dudas han sido aclaradas. Con mi firma voluntaria de este documento consiento a donar mis dientes extraídos para este estudio de investigación. Se me entregará una copia firmada de este documento y si solicito información, ella me será entregada por los investigadores.

Nombre del donante

Fecha

Firma del donante

Nombre del individuo que obtiene el consentimiento

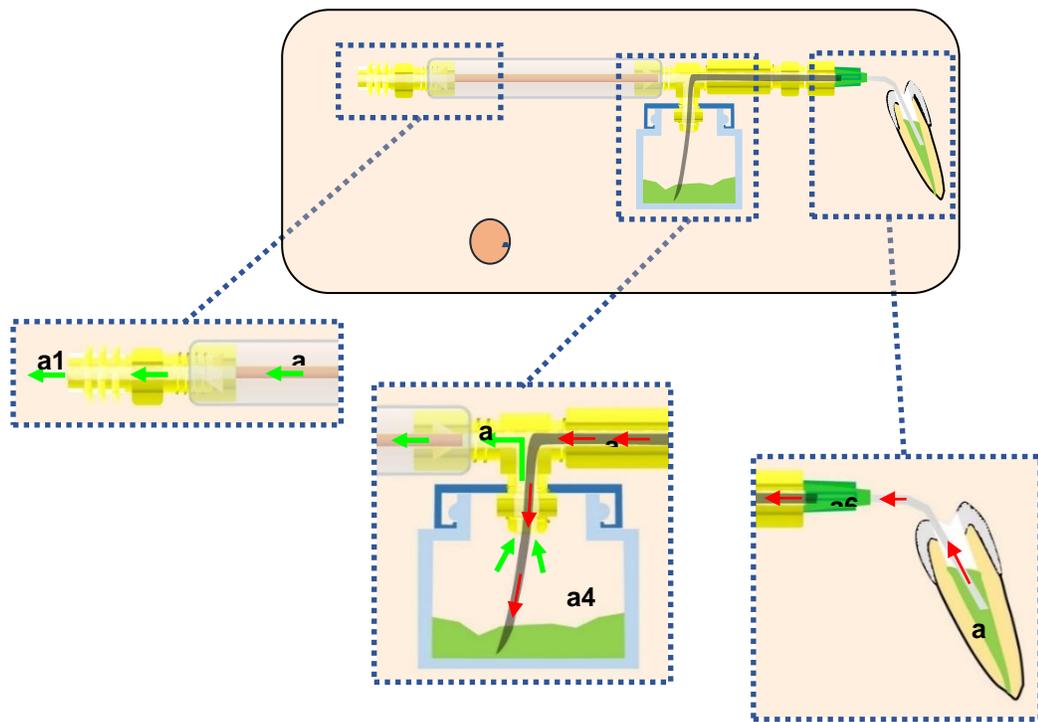
Firma

ANEXO 3

DISPOSITIVO PARA TOMA DE MUESTRAS

El dispositivo para toma de muestras fue creado, diseñado y construído por el Dr. Mauricio Ruiz Nolf. Los materiales de construcción usados fueron elementos roscados de bronce (niples, conos de expansión y tees), cañería de cobre recocido de 3/16" de diámetro, un frasco de vidrio con tapa roscable de 28 ml de capacidad, aproximadamente 10 cm de manguera de poliamida negra de 3 mm de diámetro, y una aguja de grado medico 23G.

En la figura A se muestra el esquema del dispositivo. El vacío del eyector en a1 se transmite a través de la cañería a2 y de la tee a3 hasta el interior del contenedor de vidrio a4. El vacío dentro del contenedor a4 se aplica sobre la manguera de poliamida a5 hasta la aguja a6. Finalmente, el vacío se ejerce en la punta de la aguja en a7, lo que permite la succión de los fluidos contenidos dentro de la cavidad pulpar en dirección al frasco contenedor a4.



ANEXO 4

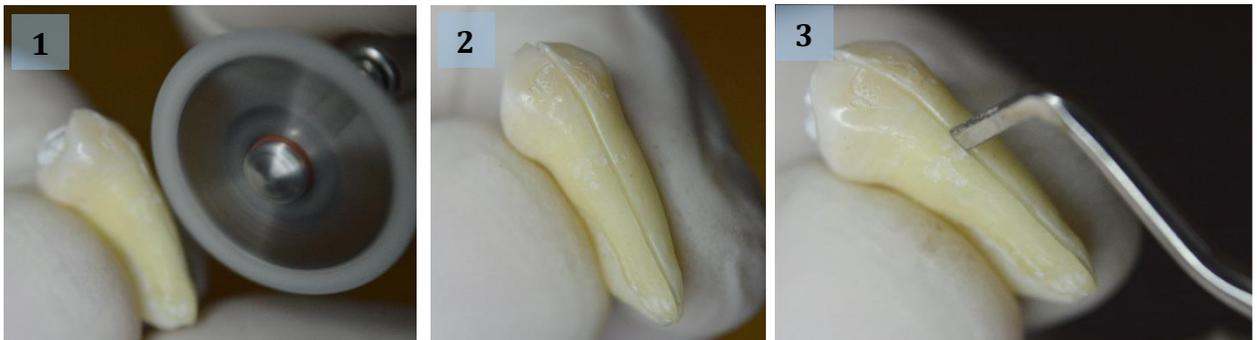
PROTOCOLO DE CORTE DENTARIO PARA MICROSCOPIA

Corte dentario

1° Mantener los dientes bajo refrigeración a 4°C hasta el momento de su corte.

2° Rellenar la Cavidad de Acceso Endodóntica con algodón.

3° Emplear una pieza de mano con un disco de corte de acero diamantado de 0,2 mm de espesor para realizar un corte longitudinal incompleto en el diente (*abajo, fig 1*) y en sentido vestibulo-palatino (*abajo, fig 2*). Mediante una hachuela de esmalte (15-8-12, HuFriedy) provocar la fractura longitudinal (*abajo, fig 3*).



4° Conservar las dos mitades bajo refrigeración a 4°C hasta que sean procesados para microscopía (*derecha, fig 4*).



ANEXO 5

Protocolo de preparación de muestras para Microscopía de Barrido

1° Etapa de deshidratación: sumergir cada muestra en alcoholes ascendentes de 50°,70°,95°,100°I y 100° II durante 5 minutos cada uno.

2° Etapa de secado de punto crítico: colocar las muestras en el Secador de punto crítico (AUTOSAMDRI-815, SERIES A OVERVIEW) durante 45 minutos, donde la muestra es secada para remover todas las moléculas de agua a través de CO₂.

3° Etapa de Metalizado con oro: una vez secas las muestras son montadas en portamuestras de aluminio y posteriormente se metaliza con oro en METALIZADOR DENTON VACUMM DESK V.

4° Almacenar en cápsulas Petri hasta su utilización.

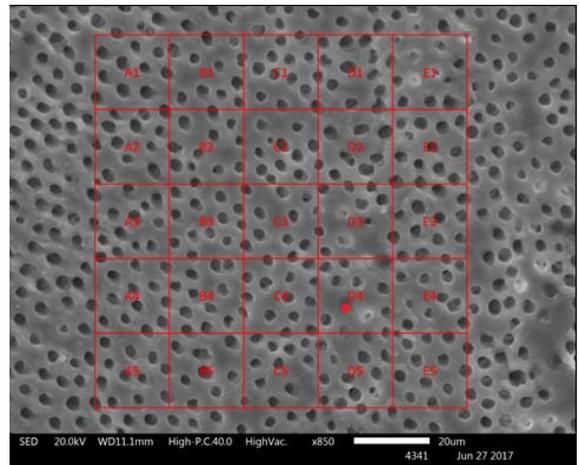
ANEXO 6

Protocolo de selección de áreas de análisis y recuento tubular

1° Analizar en MEB Jeol Modelo JSM IT300LV.

2° Seleccionar las áreas de interés del canal radicular, teniendo cuidado de NO incluir las áreas de la cámara pulpar, tabicaciones o istmos:

- De cada mitad de diente seleccionar 5 áreas de 100x100 μm del CANAL radicular a diferentes alturas para un total de 10 áreas. El área del canal a evaluar comprenderá desde el límite amelo-cementario (LAC) hasta aproximadamente el área CDC.
- En caso de raíces con 2 canales seleccionar 5 áreas de 100x100 μm de cada canal a diferentes alturas en cada mitad dentaria para un total de 20 áreas. El área del canal a evaluar comprenderá desde el área de la furca hasta aproximadamente el área CDC.



3° Realizar el recuento sobre imágenes

en formato Tif aumentadas x850 y una rejilla con 4x4 divisiones de 25 μm cada una para un área total de 100x100 μm (*derecha*). Usar los criterios:

- Abierto: túbulo dentinario totalmente abierto sin signo alguno de detritus o depósitos.
- Parcialmente ocluido: túbulo parcialmente visible. Debe consignarse el porcentaje aproximado de oclusión (25%, 50% ó 75%).
- Totalmente ocluido: hay alguna evidencia de la presencia de un túbulo no visible por la presencia de detritus que impiden la visualización de más del 75% del túbulo.

4° Seleccionar, en la parte media del cada canal y cada mitad dentarias, un túbulo dentinario totalmente abierto y otro 50% ocluido. Realizar el análisis elemental con el MEB seleccionando Cl, Na, O y N. Realizar histograma y guardar en formato Tif.