



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

**EFFECTO DE DIFERENTES SOLUCIONES ALCOHÓLICAS UTILIZADAS
COMO IRRIGANTES INTERMEDIOS ENTRE HIPOCLORITO DE SODIO 5% Y
CLORHEXIDINA 2% EN EL GRADO DE OBLITERACIÓN TUBULAR.
ANÁLISIS MICROSCÓPICO Y QUÍMICO. ESTUDIO *EX VIVO*.**

Anselmo Francisco Valdivia Martínez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Mauricio Ruiz Nolf

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Ismael Yévenes López

Prof. Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2019



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

**EFFECTO DE DIFERENTES SOLUCIONES ALCOHÓLICAS UTILIZADAS
COMO IRRIGANTES INTERMEDIOS ENTRE HIPOCLORITO DE SODIO 5% Y
CLORHEXIDINA 2% EN EL GRADO DE OBLITERACIÓN TUBULAR.
ANÁLISIS MICROSCÓPICO Y QUÍMICO. ESTUDIO *EX VIVO*.**

Anselmo Francisco Valdivia Martínez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Mauricio Ruiz Nolf

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Ismael Yévenes López

Prof. Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2019

AGRADECIMIENTOS

Llega el cierre de una etapa difícil, que no ha sido difícil solo para mí. Es por eso que me gustaría agradecer a todos quienes me acompañaron (y soportaron) tanto en el proceso de tesis como durante toda la carrera.

A mis papás, por apoyarme y alentarme en todo momento, incluso a la distancia. Por esforzarse y sacar de la madera las herramientas con las que tanto mis hermanas como yo pudimos cumplir nuestros sueños y metas.

A mis hermanas, que desde un inicio orientaron, guiaron y acompañaron mis estudios, por ayudarme y apoyarme siempre que lo necesité y por siempre ser una importante referencia de vida.

Me gustaría agradecer a la familia Alcaíno Jirón, mi segunda familia, quienes en los pasados 8 años se han encargado de hacerme sentir como en casa y que, en palabras de la tía Sandra, desde un inicio me han tratado “como un hijo más”.

A la Javi, mi polola, que me acompañó de cerca durante todo el proceso, que calmó mis (reiteradas) frustraciones y me entregó todo su cariño. Porque se esforzó en ayudarme hasta cuando no podía más y me enseñó como nadie a trabajar realmente en equipo.

A mis profes, Dr. Ruiz, Dra. Fuenzalida y Prof. Yévenes, por confiar en mí para formar parte del proyecto y por guiarme pacientemente durante todo este proceso. Agradecer en especial a la Dra. Fuenzalida por lograr que naciera en mí un inesperado amor por la endodoncia.

Finalmente, quisiera agradecer a todos mis amigos y compañeros, con quienes pudimos ayudarnos, enseñarnos y apoyarnos siempre que fuera necesario. A mis compañeros de box, compañeros de grupo y a todos mis amigos, sepan que los conservaré cariñosamente en mis recuerdos de la U y de mi vida en Santiago.

ÍNDICE

Contenido

1.	RESUMEN	1
2.	MARCO TEÓRICO	2
2.1	Soluciones irrigantes.....	4
2.1.1	Hipoclorito de Sodio (NaClO)	4
2.1.2	Clorhexidina (CHX)	7
2.1.3	Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).....	8
2.2	Interacción entre irrigantes.....	9
2.2.1	Asociación NaClO y CHX	11
2.3	Alcohol como irrigante intermedio.....	15
3.	HIPÓTESIS	17
4.	OBJETIVO GENERAL.....	17
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1	Tipo de estudio	18
6.2	Materiales	18
6.3	Selección de la muestra	20
6.4	Procedimientos clínicos.....	21
6.4.1	Recolección de muestras.....	21
6.4.2	Tratamiento endodóntico y obtención de muestras.....	21
6.5	Procedimientos de Laboratorio	24
6.5.1	Determinación de la concentración de NaClO	24
6.5.2	Determinación de la concentración de PCA.....	25

6.5.3	Análisis estadístico de concentraciones.....	26
6.6	Determinar los grados de obliteración.....	27
6.6.1	Corte Dentario.....	27
6.6.2	Preparación de las muestras para visualización en MEB ...	28
6.6.3	Selección de áreas de análisis y recuento tubular	28
6.6.4	Análisis estadístico del grado de obliteración tubular.....	31
7.	Resultados.....	32
7.1	Concentración NaClO.....	32
7.2	Concentración de PCA:.....	33
7.3	Grado de obliteración de los túbulos dentinarios.	36
8.	Discusión.....	41
9.	Conclusiones.....	46
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
11.	ANEXOS.....	52
11.1	ANEXO 1.....	52
11.2	ANEXO 2.....	54
11.3	ANEXO 3.....	56
11.4	ANEXO 4.....	57
11.5	ANEXO 5.....	58
11.6	ANEXO 6.....	59

1. RESUMEN

Introducción: Durante el tratamiento endodóntico es necesario combinar distintos irrigantes para lograr resultados óptimos y predecibles. Al entrar en contacto dentro del sistema de canales radiculares (SCR), estas sustancias pueden generar subproductos. La combinación de hipoclorito de sodio (NaClO) y clorhexidina (CHX) logra aumentar el espectro antimicrobiano, sin embargo, forma un precipitado marrón con presencia de paracloroanilina (PCA), una sustancia tóxica y potencialmente carcinogénica que puede obstruir los túbulos dentinarios afectando el sellado del SCR. Se han propuesto diferentes irrigantes intermedios intentando disminuir la cantidad de PCA formada. Este estudio *ex vivo* busca determinar cómo varía el grado de obliteración tubular al utilizar alcohol etílico 70%, alcohol etílico 100% o alcohol isopropílico puro como irrigantes intermedios entre NaClO y CHX, y analizar si tiene correlación con la formación de PCA.

Materiales y métodos: 30 dientes humanos fueron tratados endodónticamente siguiendo una modificación al protocolo de irrigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se recolectaron 12 volúmenes por diente, los cuales fueron analizados por espectrofotometría para determinar la concentración de NaClO y PCA. Los dientes fueron cortados bajo un estricto protocolo y procesados para ser observados bajo microscopía electrónica de barrido. Se seleccionaron 10 imágenes por diente y se realizó un conteo tubular para determinar el grado de obliteración.

Resultados: Al observar las muestras bajo microscopía electrónica, el grupo de alcohol isopropílico mostró un grado de obliteración significativamente menor, seguido por el grupo de alcohol etílico 100%. La concentración de PCA formada no mostró diferencias significativas entre los tres grupos.

Conclusiones: A pesar de que la concentración de p-cloroanilina formada en los tres grupos es similar, el uso de alcohol isopropílico como irrigante intermedio entre NaClO y CHX permite el menor grado de obliteración tubular, mientras que el alcohol etílico 100% permite un menor grado de obliteración tubular respecto al alcohol etílico 70%.

2. MARCO TEÓRICO

La principal causa de fracaso de los tratamientos endodónticos se asocia a la remanencia o recolonización bacteriana sobre el sistema de canales radiculares (SCR), razón por cual uno de los principales objetivos del tratamiento endodóntico es optimizar su desinfección y prevenir su reinfección (Haapasalo y cols., 2010). Para determinar el cumplimiento de este objetivo se han descrito varios indicadores de éxito, como la presencia de signos radiográficos de disminución en el tamaño de lesiones periapicales preexistentes, y la ausencia de sintomatología clínica en un período mínimo de 1 año tras haberse realizado el tratamiento de endodoncia (Zehnder, 2006).

El abordaje del SCR es un gran desafío clínico ya que, por la complejidad de su configuración, los instrumentos endodónticos no son capaces de abarcarlos en su totalidad, y en aquellas zonas inaccesibles se pueden establecer conglomerados bacterianos organizados en *biofilm* cuya disrupción no es simple de conseguir. Por otro lado, la instrumentación mecánica de los canales radiculares genera una capa de barro dentinario que impide una correcta desinfección y una adecuada adaptación del material de obturación a las paredes del canal. La irrigación asociada con la instrumentación permite llevar agentes antimicrobianos a esas áreas inaccesibles del SCR para remover el *biofilm* y barro dentinario e incluso penetrar en los túbulos dentinarios (Darcey y cols., 2016).

La irrigación es un elemento clave durante la terapia endodóntica y tiene objetivos mecánicos, químicos y biológicos (Haapasalo y cols., 2014). Los objetivos mecánicos y químicos son eliminar detritus, lubricar el canal, disolver tejido orgánico e inorgánico y prevenir la formación de una capa de barro dentinario durante la instrumentación o disolverla si ya se ha formado. Los objetivos biológicos son tener alta eficacia contra microorganismos anaerobios y facultativos tanto en su estado planctónico como en *biofilm*, tener la habilidad de inactivar endotoxinas y no presentar toxicidad al establecer contacto con tejidos vitales, no ser nocivo con tejidos periodontales ni provocar reacciones anafilácticas (Basrani y Haapasalo, 2012).

Así, Basrani y Haapasalo (2012) definen como características del irrigante ideal las siguientes:

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 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 interferir con la reparación de los tejidos periapicales.
10. No pigmentar la estructura dentaria.
11. Poder inactivarse en medios de cultivo.
12. No inducir una respuesta inmune mediada por células. No antigénico, no tóxico y no carcinógeno para las células del tejido que rodea al diente.
13. No tener efectos adversos sobre las propiedades físicas de la dentina expuesta.
14. No tener efectos adversos en la capacidad de sellado de los materiales.
15. Fácil de usar / aplicar.
16. Bajo costo.

A la fecha no existe una solución irrigante que posea todas estas características por sí sola. Es por esto que se hace necesario combinar dos o más sustancias en una secuencia específica para cumplir predeciblemente con todos los objetivos de la irrigación (Haapasalo y cols., 2010)

2.1 Soluciones irrigantes

2.1.1 Hipoclorito de Sodio (NaClO)

El hipoclorito de sodio (NaClO) es el irrigante más usado en endodoncia. De las soluciones usadas actualmente, es la única capaz de disolver materia orgánica dentro del canal, y por lo tanto capaz de remover tanto el tejido orgánico vital o necrótico como el *biofilm* (Haapasalo y cols., 2014).

Cuando el NaClO se encuentra en solución acuosa se genera una reacción de equilibrio dinámico donde se forma ácido hipocloroso (HClO), como el que se observa en la figura N°1 (Estrela y cols., 2002).



Hipoclorito de sodio	Agua	Hidróxido de sodio	Ácido hipocloroso	Sodio	Hidroxilo	Hidrón	Ion hipoclorito
-------------------------	------	-----------------------	----------------------	-------	-----------	--------	--------------------

Figura N°1: Equilibrio químico del hipoclorito de sodio (Estrela y cols.,2002)

El mecanismo de acción del NaClO, basado en su equilibrio químico, en contacto con tejido orgánico se ve explicado por tres diferentes reacciones fundamentales:

- 1) **Reacción de saponificación:** El NaClO transforma los ácidos grasos de las grasas de los tejidos, en sus sales respectivas (jabón) y glicerol (alcohol), lo que produce a su vez una disminución en la tensión superficial del remanente (figura N°2) (Estrela y cols., 2002)

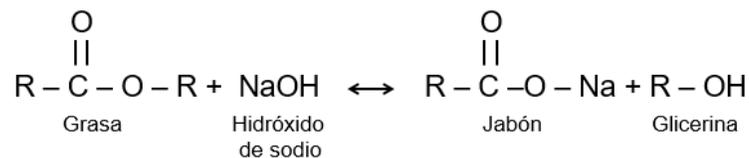


Figura 2: Reacción de saponificación (Estrela y cols.,2002)

2) Reacción de neutralización: El NaClO neutraliza aminoácidos formando sus respectivas sales y agua (reacción de neutralización, figura N°3).

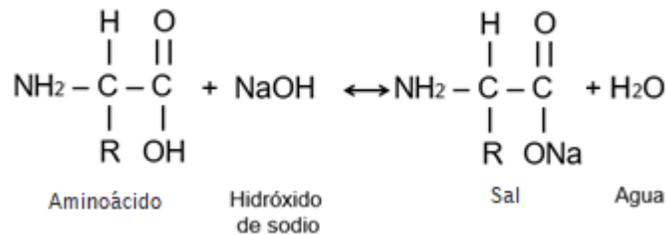


Figura N°3: Reacción de neutralización (Estrela y cols.,2002)

3) Reacción de cloraminación: Con la salida de iones hidroxilos ocurre una reducción del pH. El ácido hipocloroso (HClO) presente tras la interacción entre el NaClO y el agua actúa como solvente de tejido orgánico. Se libera ion cloruro, el que combinado con el grupo amino de las proteínas (NH₂), forma cloraminas (reacción de cloraminación, figura N°4) y se interfiere el metabolismo celular. El ácido hipocloroso y los iones de hipoclorito provocan una degradación aminoacídica e hidrólisis del tejido orgánico (Estrela y cols., 2002).

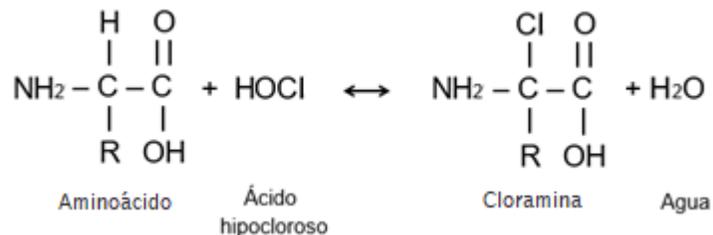


Figura N°4: Reacción de cloraminación (Estrela y cols.,2002)

No existe consenso sobre la concentración a la que se debe utilizar el NaClO como irrigante en endodoncia, siendo descritas concentraciones entre 0,5% y 6%. Así, diferentes estudios *in vitro* han intentado evaluar la efectividad del NaClO como antimicrobiano a diferentes concentraciones. Siqueira y cols. (2000) concluyeron que no existe una diferencia significativa al irrigar con hipoclorito de sodio al 1%, 2,5% o 5,25% en solución acuosa. Por otro lado, Gomes y cols. (2001) evaluaron la efectividad de NaClO en la eliminación de *E. faecalis* a concentraciones de 0,5%, 1%, 2,5%, 4% y 5,25%, demostrando que la concentración más eficiente era al 5,25%. De modo similar, Berber y cols. (2008), al asociar irrigación intracanal de

NaClO a distintas concentraciones (0,5%, 2,5% y 5,25%) con técnicas de instrumentación manual y rotatoria, encontraron que la concentración de NaClO al 5,25% resultaba ser la más efectiva para eliminar *E. faecalis*.

Un factor relevante a considerar al utilizar NaClO como irrigante endodóntico es el gran impacto que los tejidos orgánicos tienen en su actividad antibacteriana. Diversos estudios *in vivo* muestran que la presencia de materia orgánica (exudado inflamatorio, remanentes de tejido, biomasa microbiana) consume el NaClO y debilita su efecto, por lo que realizar una irrigación continua y considerar el tiempo en que el irrigante está en contacto con los tejidos son factores importantes en la efectividad del hipoclorito (Haapasalo y cols., 2010). Del mismo modo la concentración, temperatura y grado de agitación son elementos que incrementan los efectos de este irrigante sobre el tejido orgánico (Stojicic y cols., 2010).

La capacidad del NaClO para remover *biofilm* bacteriano también ha sido estudiada. Dunavant y cols. (2006), compararon la eficacia de NaClO al 1% y 6% con la eficacia de otros 4 irrigantes (SmearClear, CHX 2%, REDTA y BioPure MTAD) en la remoción de *biofilms* de *E. faecalis*, demostrando el NaClO tanto en una concentración de 1% como de 6% presenta la mayor eficiencia en la remoción del *biofilm* en comparación con el resto de los irrigantes estudiados. Del mismo modo, Giardino y cols. (2007) evaluaron la eficacia de NaClO 5,25% y MTAD en la disrupción y remoción del *biofilm*, encontrando que sólo el hipoclorito de sodio fue capaz de disgregar y remover *biofilm* de *E. faecalis*.

Por otra parte, el NaClO presenta algunos inconvenientes: inhabilidad para remover por sí solo el barro dentinario y toxicidad (Haapasalo y cols., 2010). Se han descrito algunos efectos tóxicos en tejidos vitales, resultando en hemólisis, ulceración cutánea y necrosis. Otras posibles complicaciones al utilizar este irrigante durante el tratamiento endodóntico son el daño ocular al ser inoculado accidentalmente, la inyección de NaClO más allá del foramen apical y también se han descrito de reacciones de hipersensibilidad al hipoclorito de sodio en algunos pacientes (Mohammadi, 2008).

A pesar de sus limitaciones, el hipoclorito de sodio es el irrigante más utilizado en endodoncia ya que es el único capaz de disolver el tejido orgánico incluyendo el

biofilm y la porción orgánica del barro dentinario (Haapasalo y cols., 2010). La eliminación completa del barro dentinario se logra utilizando un agente quelante como el ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) o ácido cítrico (AC) como irrigante final posterior al uso de hipoclorito de sodio previo a la medicación o la obturación del canal radicular preparado (Zehnder, 2006).

2.1.2 Clorhexidina (CHX)

Químicamente, la CHX es un compuesto sintético formado por dos grupos biguanida y dos anillos 4-clorofenil simétricos, conectados por una cadena hexametileno (figura N°5). Es una molécula hidrofóbica que interactúa con los liposacáridos y fosfolípidos de la membrana bacteriana. Debido a su naturaleza catiónica, interactúa con la carga negativa de la pared bacteriana alterando su equilibrio osmótico. El aumento de la permeabilidad permite la entrada de CHX a la célula. En altas concentraciones (2%) presenta un efecto bactericida, haciendo precipitar el contenido citoplasmático. En bajas concentraciones (0,2%) provoca la salida de calcio y potasio de la célula, actuando como un elemento bacteriostático (Mohammadi y cols., 2014).

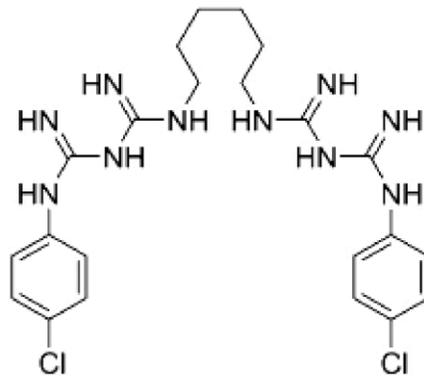


Figura N°5: Estructura molecular Clorhexidina

Al ser un potente antiséptico en odontología es utilizado en concentraciones de 0,1 a 0,2% para el control químico de la microbiota de la cavidad oral y en concentración de 2% como irrigante y como medicamento intracanal. No obstante, al no tener capacidad de disolver tejido orgánico, no puede reemplazar al NaClO durante el tratamiento endodóntico (Zehnder, 2006; Haapasalo y cols., 2010).

Dada su carga positiva, la CHX logra interactuar con las superficies con las que toma contacto (cargadas negativamente) desarrollándose un fenómeno conocido como sustantividad, que le otorga la capacidad de mantener un efecto terapéutico por un tiempo prolongado posterior a su aplicación (Khademi y cols., 2006). Así, la adsorción de iones de CHX cargados positivamente a la pared dentinaria previene su colonización durante un periodo que excede la aplicación del medicamento. Algunos estudios indican que la sustantividad de CHX al 2% es de 2 a 3 días, sin embargo, en otros se informa que podría persistir de 4 a 12 semanas (Mohammadi y cols., 2014)

Varios estudios han comparado el efecto de la CHX 2% con NaClO, mostrando mínima o nula diferencia en la efectividad antibacteriana de ambos. Sin embargo, a pesar de eliminar microorganismos, la CHX no es capaz de remover *biofilm* u otros restos orgánicos y presenta una capacidad antifúngica menor (Haapasalo y cols., 2010; Mohammadi y cols., 2014). Al comparar *in vitro* la CHX 2% con el Hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) se observa una eficacia antibacteriana similar o incluso mayor de la CHX. Un estudio *in vivo* indica que la CHX logra reducir la cantidad de bacterias tan efectivamente como Ca(OH)_2 al aplicarse por una semana (Basrani y Haapasalo, 2012).

A pesar de ser útil como un irrigante final, la CHX no puede ser utilizada como irrigante principal en el tratamiento endodóntico estándar porque: (a) es incapaz de disolver tejido necrótico remanente, y (b) es menos efectiva frente a bacterias Gram negativo que Gram positivo (Zehnder, 2006). Además, se han reportado reacciones anafilácticas (como angioedema y urticaria) luego de la exposición cutánea a CHX (Mohammadi y cols., 2014)

A pesar de las limitaciones de este compuesto, su propiedad de sustantividad representa una ventaja sobresaliente, y la hace ideal para usarse como irrigante final (Mohammadi y cols., 2014)

2.1.3 Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

El EDTA es un ácido poliamino carboxílico incoloro y soluble en agua,

constituido por cuatro grupos acéticos unidos a etilendiamina formando la estructura que se observa en la figura N°6. Como agente quelante, se une a los iones metálicos di- y tri-catiónicos (entre ellos el calcio) generando una fuerte unión a una estructura en forma de anillo, la cual evita que pueda interactuar en posteriores reacciones (Seidberg y Schilder, 1974; Basrani y cols., 2012).

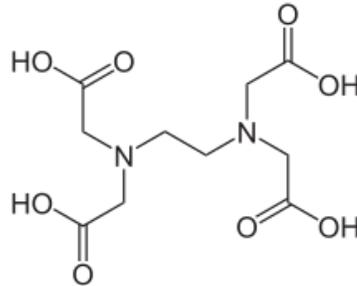


Figura N°6: Estructura molecular Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

En odontología, un agente quelante como el EDTA captura los iones calcio de los cristales de hidroxiapatita al usarse como irrigante endodóntico y permite eliminar la porción inorgánica del barro dentinario, siendo necesario complementar con un irrigante capaz de remover la porción orgánica como el NaClO. (Seidberg y Schilder, 1974; Goldman y cols., 1982; Haapasalo y cols., 2014).

Al utilizarse en concentraciones del 17% durante un minuto seguido de la irrigación con NaClO 5% es capaz de eliminar casi la totalidad del barro dentinario. Crumpton y cols. (2005) señalan que el volumen utilizado no es relevante, pues acorde a sus resultados 1 mL de EDTA al 17% en contacto con la pared dentinaria genera el mismo efecto que 10 mL. Por otro lado, Calt y Serper (2002) señalan que el tiempo de aplicación es de gran relevancia, recomendando no utilizar EDTA al 17% por un tiempo mayor a 1 minuto para evitar la erosión de las paredes dentinarias.

2.2 Interacción entre irrigantes

Dado que no existe un irrigante que por sí solo cuente con todas las características de un irrigante ideal, se hace necesario aplicar diferentes agentes irrigantes en forma secuencial, pudiendo quedar restos del primer irrigante dentro del canal al aplicar el siguiente, existiendo la posibilidad que interactúen entre sí dentro del canal radicular (Haapasalo y cols., 2014; Basrani y Haapasalo, 2012;

Fedorowicz y cols., 2012). Al combinar irrigantes existe contacto entre las distintas soluciones, con lo que pueden generarse subproductos dentro del SCR (Prado y cols., 2013). Los subproductos generados por la interacción de irrigantes podrían resultar tóxicos para los tejidos periapicales o precipitar obliterando los túbulos dentinarios, interfiriendo así con la desinfección y el sellado del SCR (Krishnamurthy y Sudhakaran, 2010).

A pesar de que la interacción de NaClO a diferentes concentraciones (1% a 5,25%) con EDTA al 17% no produce precipitado, al combinarse se genera una reacción exotérmica con formación de burbujas, las que principalmente son gas cloro, un producto tóxico (Prado y cols., 2013) (figura N°7). Adicionalmente, el NaClO pierde el efecto de disolver tejido orgánico y disminuye importantemente su forma aniónica (Cl^-), con lo que pierde efectividad antibacteriana y disolvente del tejido necrótico. Es por lo anterior que ambas soluciones deben ser usadas separadamente, utilizando irrigantes intermedios para aminorar su interacción (Grawehr y cols., 2003; Zehnder, 2006).

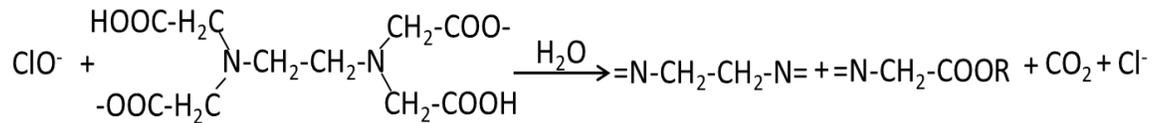


Figura N°7. Reacción entre EDTA e Hipoclorito de sodio

La combinación de CHX con EDTA produce un precipitado lechoso como el que se observa en la figura N°8 (Basrani y Haapasalo, 2012). Se produce una reacción ácido-base, formando principalmente sales de EDTA y CHX (Rasimick y cols., 2008; Prado y cols., 2013). Por otro lado, la combinación de CHX con solución salina resulta en una precipitación de sal a los 5 segundos, mientras que al combinar CHX con agua destilada no se produce precipitado alguno (Prado y cols., 2013).

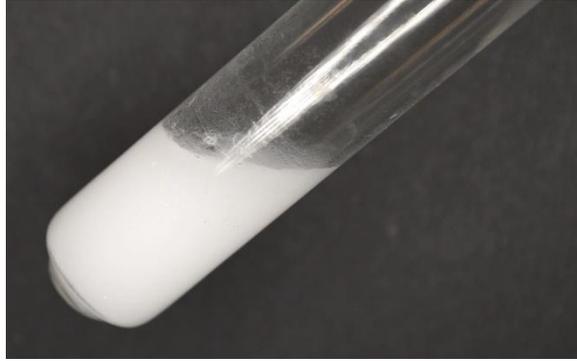


Figura 8: Mezclar EDTA y Clorhexidina resulta en una inmediata formación de un precipitado blanco

2.2.1 Asociación NaClO y CHX

Al combinar NaClO a diferentes concentraciones con CHX al 2% se genera un precipitado de color marrón-anaranjado como puede apreciarse en la figura N°9 producto de la reacción ácido-base que ocurre entre la CHX, ácido di catiónico con habilidad de donar protones, y el NaClO, compuesto alcalino capaz de recibir protones (figura N°10) (Haapasalo y cols., 2010; Mohammadi y Abbott, 2009).



Figura N°9: Precipitado naranja formado al mezclar Clorhexidina con Hipoclorito de sodio (Haapasalo y cols., 2010)

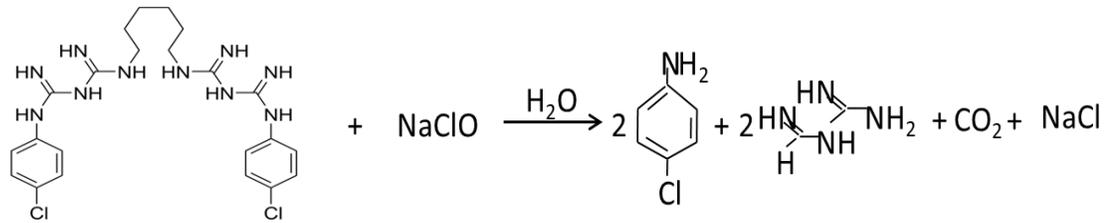


Figura N°10 Ecuación de la reacción entre Clorhexidina e Hipoclorito de sodio

La evidencia de ciertos autores sugiere fuertemente que a partir de esta reacción se genera un compuesto llamado Paracloroanilina, p-cloroanilina, 1-amina-4-clorobenceno o PCA (figura N°11) (Basrani y cols., 2007; Bui y cols., 2008; Mortenson y cols., 2012; Kolosowski y cols., 2014; Arslan y cols., 2015).

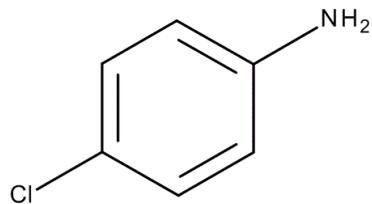


Figura N°11: Estructura molecular Paracloroanilina

Basrani y cols (2007) describen que la formación de precipitado se relaciona directamente con la concentración de NaClO y que 0,023% resulta ser la mínima concentración de NaClO con la que se observa un cambio de coloración de la solución y 0,19% la menor en la que se forma precipitado (figura N°12). No obstante, ha sido descrito que, en presencia de calor, luz y un ambiente alcalino la CHX podría hidrolizarse espontáneamente y así generar PCA incluso en ausencia de NaClO (figura N°13) (Basrani y cols., 2007). Así, Barbin y cols. (2013) pudieron detectar PCA en soluciones de CHX al 2% al transcurrir 7 días en condiciones de 95% de humedad relativa y 36,5°C.



Figura N°12: Tubos con diferentes concentraciones de Hipoclorito de sodio mezclado con Clorhexidina 2%. La concentración de NaClO descende de 6,0% a 0,023% desde el tubo 1 al 9 respectivamente. Tubo 10 contiene NaClO 6% y tubo 11 CHX 2%. (Basrani y cols 2007)

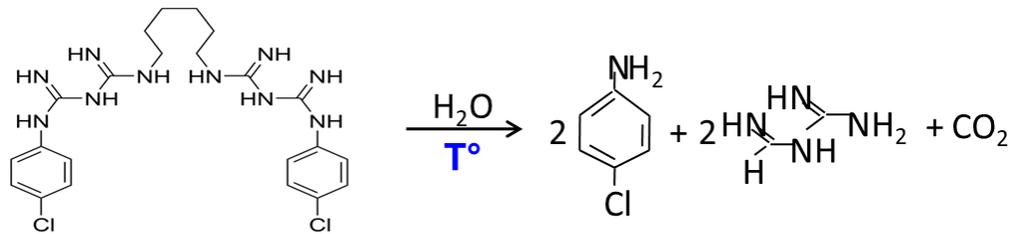


Figura N°13. Descomposición de Clorhexidina en Paracloroanilina por efecto del calor

La PCA es clasificada como un agente potencialmente carcinogénico por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IACR). De modo similar, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera un agente tóxico, ya sea por inhalación, digestión o contacto con la piel, ojos o mucosas. Los efectos tóxicos más importantes se deben a la formación de enlaces covalentes con la hemoglobina y las proteínas en el hígado y riñones, generando así problemas en el transporte de oxígeno en la sangre. Estudios en animales han demostrado que una exposición continua a PCA produce cianosis y metahemoglobinemia, seguida de alteraciones en el hígado, bazo y riñones, manifestadas a través de cambios en parámetros hematológicos, esplenomegalia y hemosiderosis moderada a grave en bazo, hígado y riñones, parcialmente acompañada de hematopoyesis extramedular. Tales efectos ocurren tras una hemólisis excesiva inducida por PCA y son coherentes con una anemia hemolítica (OMS, 2003; OMS, 2006).

Considerando solamente los efectos no neoplásicos como la

metahemoglobinemia, se considera que la exposición humana máxima a PCA está en el orden de 2µg/kg de peso/día. Una exposición aguda a altas concentraciones podría ser mortal (Boehncke y cols., 2003).

Al analizar la ultraestructura de las paredes radiculares por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) luego de la irrigación con NaClO y CHX se ha detectado obliteración de túbulos dentinarios en el tercio medio y cervical, lo cual podría afectar la limpieza y sellado del SCR, y con ello también el éxito del tratamiento (Gasic y cols., 2012, Bui y cols., 2008; Krishnamurthy y Sudhakaran, 2010; Mortenson y cols., 2012).

Una forma simple de evitar interacciones entre dos irrigantes en el canal es intentar eliminar por dilución los restos del primer irrigante antes de aplicar el segundo mediante un irrigante intermedio. Krishnamurthy y Sudhakaran (2010) examinaron la formación de PCA bajo estereomicroscopía utilizando diferentes irrigantes intermedios entre NaClO 2,5% y CHX 2%. Determinaron que al usar agua destilada y solución salina existía formación de precipitado. Según Prado y cols. (2013), al asociar NaClO y CHX al 2% con uso de agua destilada como irrigante intermedio no ocurre formación de precipitados. Así, el agua destilada parece ser la solución más indicada para evitar la formación de PCA.

Por otro lado, Riquelme y cols (2015) evaluaron *in vitro* la formación de PCA utilizando suero fisiológico y agua destilada. Determinaron que producto de la interacción que existe entre el suero fisiológico y CHX que forma una precipitación salina, queda menos CHX disponible para producir PCA. Por otro lado, el agua destilada reduce la formación de PCA, pero no por completo, pues sólo reduce la concentración de NaClO residual.

Cruz y cols. (2018) encontraron en un estudio *ex vivo* una disminución significativa en la concentración de PCA al usar agua destilada como irrigante intermedio entre NaClO y CHX respecto al control suero fisiológico. Además, observaron una importante disminución en la obliteración de los túbulos dentinarios en el grupo en el que se utilizó agua destilada como irrigante intermedio respecto del grupo control al ser evaluado en microscopía electrónica de barrido

En suma, considerando los posibles efectos de la PCA tanto para la salud

como para el pronóstico del tratamiento endodóntico, es relevante controlar, prevenir y predecir su formación a través de un eficiente protocolo de irrigación intracanal. Se han descrito diversos irrigantes intermedios para reducir su formación, como agua destilada, alcohol o suero fisiológico (Krishnamurthy y Sudhakaran, 2010).

2.3 Alcohol como irrigante intermedio

Un alcohol es un compuesto orgánico que contiene el grupo funcional hidroxilo (OH) unido a un radical alifático o a alguno de sus derivados (Chang, 2011).

Sus propiedades de volatilidad, tensioactividad y alta electronegatividad le permiten penetrar los túbulos dentinarios, con lo que son capaces de remover el NaClO residual presente dentro del canal radicular y secar los canales previo a la obturación (Krishnamurthy y Sudhakaran, 2010).

Existen distintos estudios que proponen el uso de algunos tipos de alcoholes como irrigantes intermedios entre NaClO y CHX 2% para prevenir o disminuir la formación de PCA.

Reyes (2015) comparó el uso de alcohol etílico 70% con suero fisiológico, encontrando que la utilización de alcohol etílico 70% como irrigante intermedio entre la irrigación con NaClO 5% y CHX 2% disminuye significativamente la formación de PCA.

Un estudio *ex vivo* realizado por Farías y cols. (2017) evaluó el efecto del alcohol absoluto en la formación de PCA, determinando que usar alcohol absoluto como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2% es más efectivo que usar suero fisiológico para disminuir la formación de PCA.

En el estudio de Cruz y cols. (2018) se comparó *ex vivo* la formación de PCA y de precipitado sobre los túbulos dentinarios al usar suero fisiológico, agua destilada o alcohol etílico 70% como irrigante intermedio entre NaClO y CHX 2%, observándose que, en comparación con el suero fisiológico, el alcohol etílico 70% forma significativamente menos precipitado, sin embargo, al compararse con agua destilada se concluyó que es ésta la que permite el mayor grado de túbulos no obliterados de los tres grupos.

Krishnamurthy y cols (2010) compararon en un estudio *ex vivo* mediante estereomicroscopía la formación de precipitado anaranjado dada por la interacción entre NaClO y CHX 2%, con un grupo control en el que no se utilizó irrigante intermedio y 4 grupos experimentales en los que se utilizó suero fisiológico, agua destilada y alcohol isopropílico puro. En este estudio se concluyó que a pesar de que existía una disminución en la formación de precipitado al utilizar todos los irrigantes intermedios, según los autores, el único capaz de prevenir su formación fue el alcohol isopropílico.

Este estudio busca determinar si el uso de distintos alcoholes como irrigantes intermedios entre NaClO 5% y CHX 2% genera cambios a nivel del grado de obliteración de los túbulos dentinarios del canal radicular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), y además analizar si existe asociación en la formación de PCA y grado de obliteración tubular).

3. HIPÓTESIS

El uso de distintos alcoholes como irrigantes intermedios entre NaClO 5% y CHX 2% genera distintos grados de obliteración de los túbulos dentinarios.

4. OBJETIVO GENERAL

Comparar el grado de obliteración de los túbulos dentinarios al utilizar diferentes soluciones alcohólicas como irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y CHX al 2% en el tratamiento endodóntico *ex vivo*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los grados de obliteración de los túbulos dentinarios en las paredes del canal radicular al utilizar alcohol etílico 70%, alcohol etílico al 100% y alcohol isopropílico puro como irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y CHX al 2%.
2. Determinar las concentraciones de PCA formadas por la interacción entre NaClO al 5 % con CHX al 2%, al utilizar alcohol etílico 70%, alcohol etílico 100% y alcohol isopropílico puro como irrigantes intermedios durante el tratamiento endodóntico e identificar si existen diferencias entre ellas.
3. Comprobar si existe correlación entre las concentraciones de PCA detectadas y el grado de obliteración de los túbulos dentinarios.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

Este es un estudio prospectivo, experimental y explicativo *ex vivo* con un tamaño muestral (n) de 30.

6.2 Materiales

Para realizar el tratamiento endodóntico y la recolección de muestras por etapas se utilizaron los materiales enlistados en la Tabla N°1

Tabla N°1: 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 Dr. Mauricio Ruiz
<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.º 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% m/v. NaOCl, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA.
<ul style="list-style-type: none"> ● Clorhexidina Digluconato solución 2% m/v. Chlorhexidine Digluconato solution 20% in H₂O, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA.
<ul style="list-style-type: none"> ● EDTA 10% m/v EDTA, Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany.
<ul style="list-style-type: none"> ● Agua Destilada Laboratorio de Química, Facultad de Odontología, U. de Chile.

Los reactivos utilizados durante la recolección de muestras y procesamiento de estas en el laboratorio están enlistados en la tabla N°2.

<p>Tabla N°2: Materiales y reactivos para procedimientos de laboratorio</p> <p>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.</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● Tubos Eppendorf 1,5 mL. Biologix Group Limited, No.2766 Ying XiuRoad, High-Tech Industrial Development Zone Jinan, Shandong 250101 P.R. China.
<ul style="list-style-type: none"> ● Micropipetas 100 y 1000 Labopette®. Hirschmann, Inc. Holloway Road, Suite 104 Bluegrass Industrial Park. Louisville, KY 40299, USA.
<ul style="list-style-type: none"> ● Centrifuga Hermle z216 MK. HERMLE Labortechnik GmbH, Siemensstr 25 D-78564, Wehingen, Alemania.
<ul style="list-style-type: none"> ● Ácido Clorhídrico 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"> ● Nitrito de Sodio Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania.
<ul style="list-style-type: none"> ● Sulfamato de Amonio.

Sigma-Aldrich ChemieGmbH Munich, Germany.
<ul style="list-style-type: none"> • Naftiletilindiaminadihidrocloruro. Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA.
<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol etílico Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania.
<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol Isopropílico Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania.
<ul style="list-style-type: none"> • Cubetas de cuarzo 1cc. Scientech, Inc. 5649 Arapahoe Avenue Boulder, CO 80303-1399, USA.
<ul style="list-style-type: none"> • Espectrofotómetro UNICAM®UV/VIS ThermoSpectronicUnicam UV-530 UV-Visible, Rochester, NY, USA.

Los materiales e instrumentos utilizados para preparar los dientes para su observación en microscopía electrónica de barrido están en la lista de la Tabla N°3.

Tabla N°3: Materiales para análisis microscópico
<ul style="list-style-type: none"> • Microscopio electrónico de barrido Jeol Modelo JSM IT300LV.
<ul style="list-style-type: none"> • Secador de punto crítico AUTOSAMDRI-815, SERIES A OVERVIEW.
<ul style="list-style-type: none"> • Metalizador DENTON VACUMM DESK V.
<ul style="list-style-type: none"> • Discos de acero diamantado de 0,2 mm. SS White Burs, Inc.1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA.
<ul style="list-style-type: none"> • Hachuela de esmalte 15-8-12 (para fractura longitudinal de muestras) Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse.

6.3 Selección de la muestra

En este estudio se comparó la concentración de PCA y el grado de obliteración tubular en dientes humanos tras utilizar alcohol etílico 70% como grupo control y en los grupos experimentales alcohol etílico 100% y alcohol isopropílico puro como irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y CHX al 2% en un tratamiento

endodóntico. 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).

6.4 Procedimientos clínicos

6.4.1 Recolección de muestras

Para plantear el modelo *ex vivo* de este estudio, se recolectaron y seleccionaron 30 dientes humanos extraídos por indicación protésica, ortodóntica o periodontal, en un rango etario aproximado de 20 a 55 años. 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.

Las muestras se obtuvieron de exodoncias realizadas en la clínica de Cirugía Maxilofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Al momento de la recolección el paciente fue informado oportunamente de las características del procedimiento y del estudio, donde se solicitó la autorización mediante la firma de Consentimiento informado detallado en el Anexo N°1.

Una vez recolectados, las muestras fueron debridados con ultrasonido y curetas periodontales. Se les tomaron radiografías y fueron almacenadas bajo refrigeración a 4°C.

6.4.2 Tratamiento endodóntico y obtención de muestras por etapa

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

Los dientes del grupo control fueron sometidos a un tratamiento endodóntico desde la cavidad de acceso hasta terminar la PQM y realizar medicación intracanal, utilizando una modificación del protocolo de irrigación endodóntica que se aplica en

la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile detallado en el Anexo N°2, utilizando alcohol etílico 70% en lugar de suero fisiológico.

El contenido del canal radicular fue recolectado utilizando un dispositivo especialmente diseñado para la investigación (diseñado y elaborado por el académico de la Universidad de Chile Dr. Mauricio Ruiz Nolf), el que se muestra en la figura N°14. Los detalles del dispositivo de succión se describen en el Anexo N°3.



Figura N°14. Dispositivo toma de muestras Dr. Mauricio Ruiz Nolf

Las muestras fueron recolectadas en 12 Fases consecutivas siguiendo la secuencia de tratamiento del protocolo endodóntico tal como se muestra en la Tabla N°4.

Tabla N°4: 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% m/v	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 alcohol etílico 70% como irrigante intermedio (IRRI), 3 veces.	N°5, 6 y 7: Obtenida durante cada IRRI.
8	Irrigación con 1 mL de EDTA al 10% m/v	N°8
9, 10 y 11	Irrigación con 3 mL de alcohol etílico 70% (IRRI), 3 veces.	N°9, 10 y 11: Obtenida durante cada IRRI.
12	Medicación con 3 mL de CHX al 2% m/v.	N°12: Obtenida durante la medicación con CHX.

Las 12 muestras recolectadas al finalizar el tratamiento endodóntico se almacenaron en frascos de vidrio estériles.

A los dientes de los grupos experimentales se les aplicó el mismo protocolo clínico de irrigación/medicación descrito en la Tabla N°4, reemplazando el alcohol etílico 70% como IRRI por alcohol etílico 100% (n=10) y por alcohol isopropílico puro (n=10) respectivamente en las fases 5, 6, 7, 9, 10 y 11. Los irrigantes fueron utilizados en el mismo volumen que el alcohol etílico 70%, es decir, un total de 18 mL de irrigante intermedio.

Para su almacenamiento, las muestras 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 -18°C hasta el momento de su análisis.

6.5 Procedimientos de Laboratorio

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

Para lograr lo anterior fue necesario realizar los procedimientos descritos a continuación:

6.5.1 Determinación de la concentración de NaClO

Para determinar la concentración de NaClO por medio de espectrofotometría se utilizó la curva de calibración representada en el Gráfico N°1. La curva está dada para concentraciones entre 0,0005% y 0,05% de NaClO.

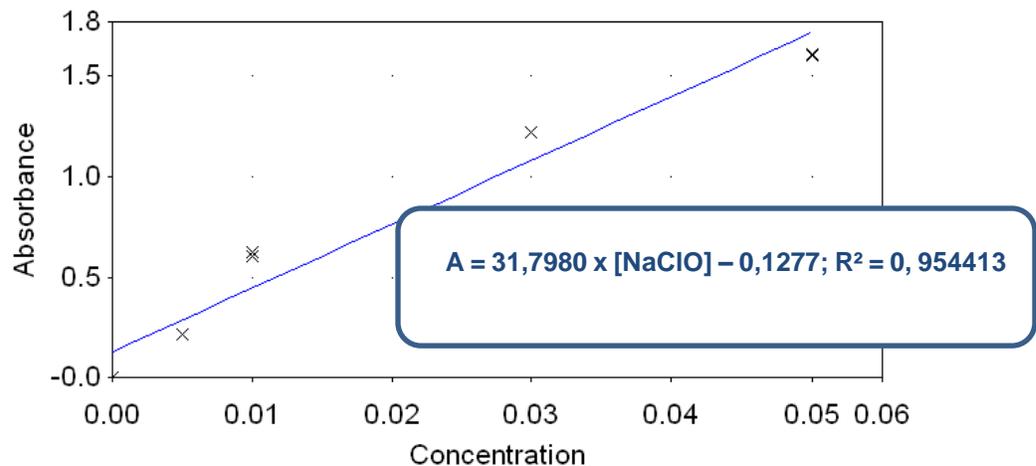


Gráfico N°1: Curva de calibración de la concentración de NaClO en relación a absorbancia a 292 nm. [NaClO]: Concentración de NaClO. A:

Absorbancia a 292 nm

Las muestras se depositaron en cubetas de cuarzo de 1 cc. y se contrastaron con un control blanco de agua destilada para la calibración del equipo. El valor de la absorbancia se midió con un espectrofotómetro UNICAM® UV/VIS y los valores obtenidos se incorporaron a la ecuación de calibración para conocer las concentraciones respectivas.

Dado que las muestras de la fase 1, 2, 3 y 4 presentaban concentraciones más altas, se realizó una dilución de 100x con agua destilada. Las muestras de las fases 5, 6, 7, 9, 10 y 11 se midieron directamente ya que las muestras se encontraban dentro de los rangos de concentración abarcados por la curva (0,0005% a 0,05%).

Para el cálculo de las concentraciones de NaClO se utilizó la ecuación de calibración representada en la ecuación N°1. En el caso de las muestras diluidas el valor obtenido fue multiplicado por el factor de dilución (x100) para conocer la concentración real.

Ecuación N°1: Ecuación de la curva de calibración para NaClO

$$[NaClO] = \frac{A + 0,1277}{31,7980}$$

[NaClO]: Concentración de NaClO. A: Absorbancia a 292 nm

6.5.2 Determinación de la concentración de PCA

La concentración de PCA se determinó aplicando 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 250µL 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.

- 36µL de Nitrito de Sodio (solución 100g/L)
- 200µL de Sulfamato de Amonio (solución 50g/L)
- 500µL NaftiletilIndiaminadihidrocloruro (solución 1g/L)
- 100µL de Alcohol (Solución Alcohol etílico 96%)

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

Para determinar la concentración de PCA, se utilizó la curva de calibración representada en el Gráfico N°2, la que fue construida para leer el complejo coloreado que forma PCA a 552 nm.

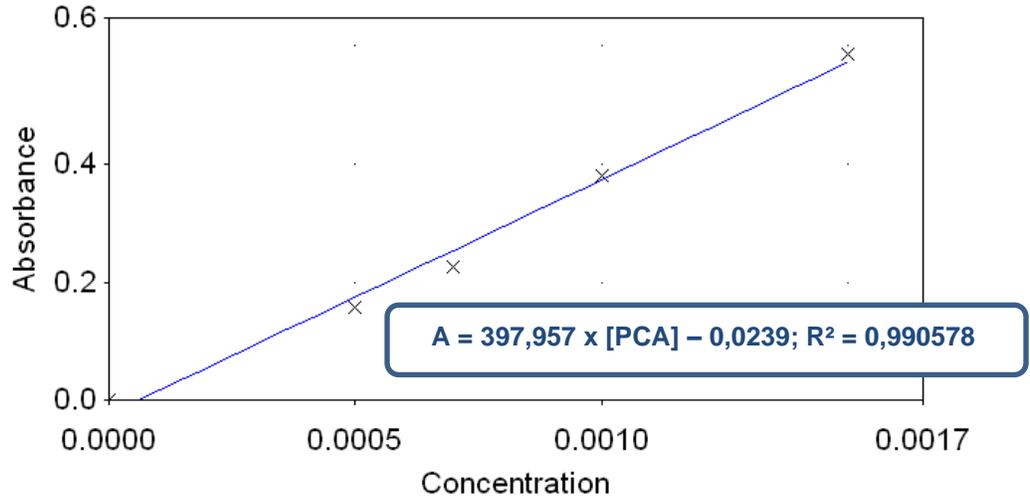


Gráfico N°2: Curva de calibración concentración de PCA en relación a absorbancia a 552 nm. A: Absorbancia. [PCA]: Concentración de PCA a 552 nm

Para el cálculo de las concentraciones de PCA se utilizó la ecuación de calibración representada en la **ecuación N°2**.

Ecuación N°2: Ecuación de la curva de calibración para PCA.

$$[PCA] = \frac{A + 0,0239}{397,957}$$

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

6.5.3 Análisis estadístico de concentraciones

Se realizó un análisis estadístico a las concentraciones determinadas en los tres grupos para encontrar diferencias significativas. Se aplicó el test estadístico de Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución, donde se observó una distribución no normal.

Para comparar los 3 grupos se aplicó el test de Kruskal Wallis con el software GraphPad, fijando el intervalo de confianza en el 95% y aceptando diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Para el análisis estadístico se compararon todas las etapas, divididos según las etapas del tratamiento endodóntico y la concentración de sustancia de interés a medir.

6.6 Determinar los grados de obliteración

Una vez realizados los procedimientos ya descritos, todos los dientes se almacenaron a 4°C hasta ser sometidos a los siguientes procedimientos y análisis.

Utilizando el 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 ello, todos los dientes fueron sometidos a los procedimientos señalados a continuación:

6.6.1 Corte Dentario

Se seccionaron todos los dientes en dos mitades en sentido vestibulo-palatino/lingual (figura N°15), respetando la secuencia específica de corte descrita en el Anexo N°4. De este modo se pudo visualizar directamente la extensión total del canal dentinario, permitiendo luego estudiar su ultraestructura en MEB.



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

6.6.2 Preparación de las muestras para visualización en MEB

Para visualizar una muestra bajo microscopía electrónica de barrido, ésta debe estar seca y ser conductora de electricidad. Por esta razón los dientes seccionados fueron sometidos a un proceso de fijación y deshidratación química, el que finalizó con un secado de punto crítico. Para otorgarle mayor conductividad a las muestras se realizó el recubrimiento o “sputtering” con oro (Au) para así obtener mejores condiciones de imagen. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en placas de Petri hasta su visualización (figura N°16). Los procedimientos detallados están descritos en el Anexo N°5.



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

6.6.3 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 N°6.

Se seleccionaron 5 áreas de cada sección del canal radicular magnificadas x850 a diferentes alturas del canal para obtener un total de 10 áreas por diente. Las imágenes fueron elegidas desde la porción central del canal para conseguir una visión perpendicular a la superficie, para así evitar discrepancias debido a la

dirección de los túbulos dentinarios. Se escogieron imágenes representativas en la extensión de los tercios del canal.

Una vez seleccionadas las imágenes de los 30 dientes a estudiar, fueron guardadas en formato TIF. Se procedió a realizar el conteo tubular mediante la selección de un área representativa delimitada por la superposición de una rejilla de 100x100 μm , subdividida en 25 áreas de 20x20 μm cada una, como se muestra en la figura N°17.

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

- **Túbulo no obliterado (NO):** túbulo dentinario totalmente abierto sin signo alguno de detritus o depósitos. (Figura N°18-a)
- **Túbulo parcialmente obliterado (PO):** túbulo parcialmente visible (25%, 50% o 75% de su porción). (Figura N°18-b)
- **Túbulo totalmente obliterado (TO):** Se evidencia un túbulo no visible debido a la presencia de detritus que impiden la visualización en más del 75%. (Figura N°18-c)

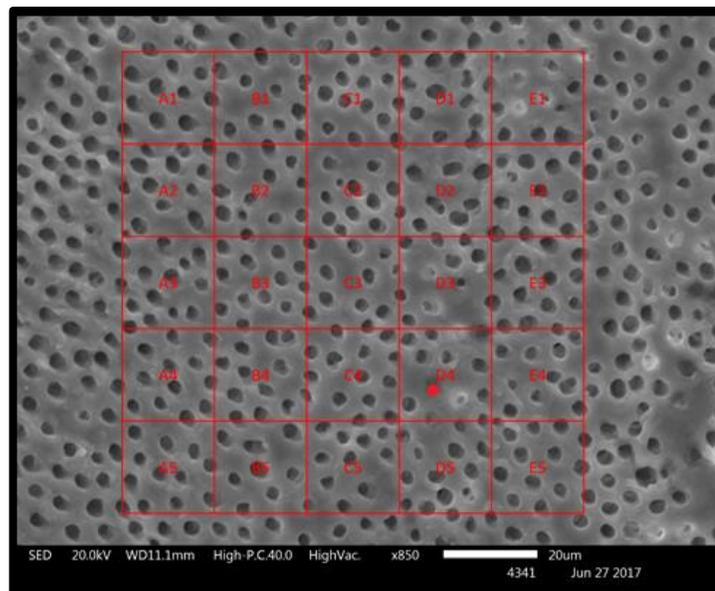


Figura N°17. Microfotografía con superposición de rejilla para conteo tubular

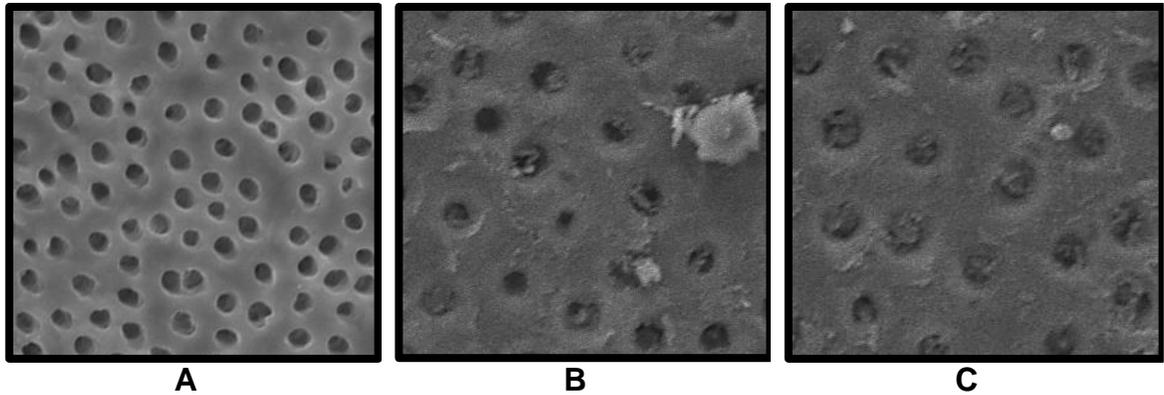


Figura N°18: Microfotografías: **(A)** Túbulos abiertos. **(B)** Túbulos parcialmente ocluidos. **(C)** Túbulos totalmente ocluidos

El conteo de los túbulos en las imágenes TIF fue realizado manualmente por un solo operador previamente calibrado utilizando la herramienta recuento de Adobe Photoshop CS. A cada criterio se le asignó un color, siendo azul para NO, amarillo para PO y rojo para TO como se observa en la figura N°19.

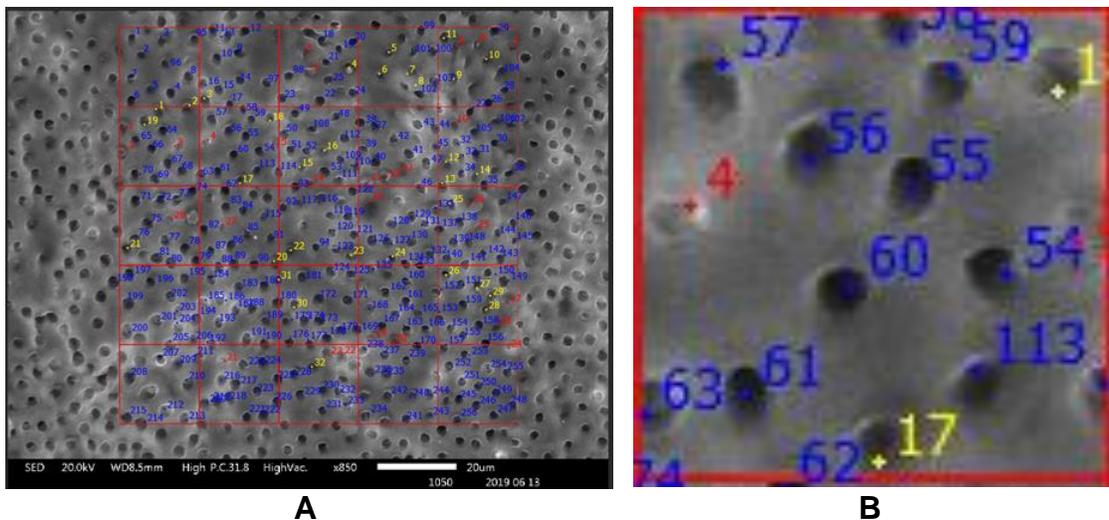


Figura N°19. **(A)** Microfotografía en Adobe Photoshop CS6 con superposición de rejilla con conteo manual. **(B)** Área de 20x20µm con etiquetas de numeración.

6.6.4 Análisis estadístico del grado de obliteración tubular

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: alcohol etílico 70%, alcohol etílico 100% y alcohol isopropílico puro. Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba estadística 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 no paramétrico de Kruskal Wallis. Para establecer el grado de significancia, se utilizó el software GraphPad Prism 7.00, fijando un intervalo de confianza del 95% aceptando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

A continuación, se muestran las concentraciones obtenidas mediante espectrofotometría, agrupadas en fases según lo antes descrito.

7.1 Concentración NaClO en etapas previas a medicación con CHX

Utilizando la curva de calibración y los valores de absorbancia obtenidos en el análisis espectrofotométrico se determinó la concentración de NaClO en cada etapa previa a la medicación con CHX al 2%. La tabla N°5 muestra la concentración de NaClO durante la preparación quimiomecánica. En esta tabla no se observan diferencias entre los grupos, pues la obtención de las muestras es previa a la irrigación intermedia.

Tabla N°5: Concentraciones de NaClO antes de la irrigación intermedia.

Grupo	Media de concentración NaClO %m/v
Alcohol etílico 70%	4,340 ± 0,419
Alcohol etílico 100%	4,119 ± 0,377
Alcohol Isopropílico	4,346 ± 0,332

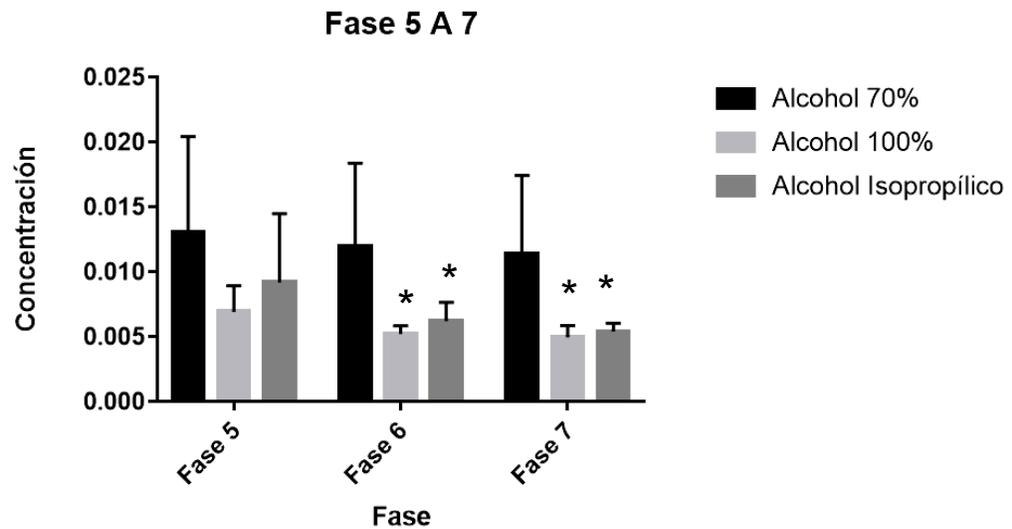


Gráfico N°3: Comparación de concentraciones de NaClO entre grupo Alcohol etílico 70%, Alcohol etílico 100% y Alcohol Isopropílico durante las fases 5 a 7. (*): $p < 0,05$.

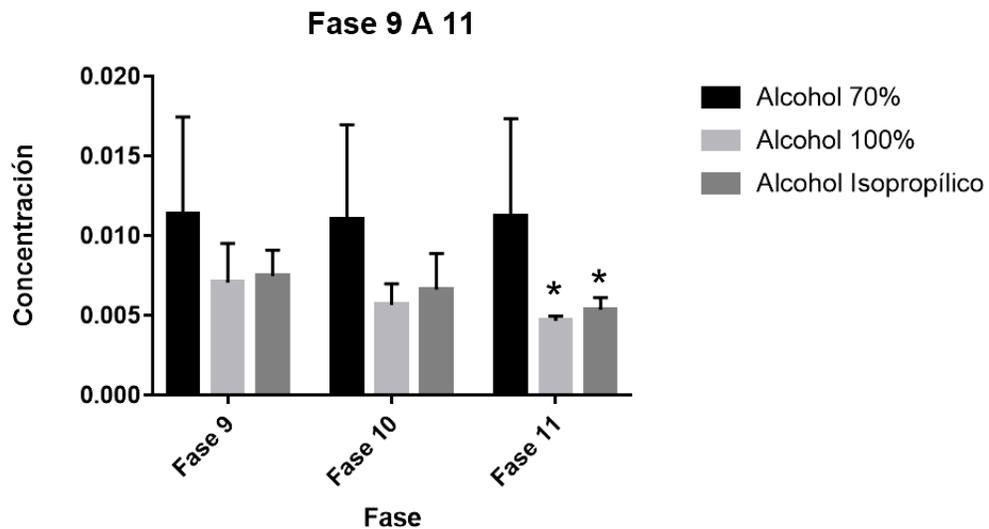


Gráfico N°4: Concentraciones de NaClO en grupo Alcohol etílico 70%, Alcohol etílico 100% y Alcohol Isopropílico durante las fases 9 a 11. (*): $p < 0,05$

Es posible observar que en las fases 6 y 7 existe una concentración significativamente menor de NaClO en los grupos experimentales (en los que se utilizó alcohol etílico 100% y alcohol isopropílico) en comparación al grupo control. De modo similar, se observa una concentración significativamente menor de NaClO en la fase 11 en los grupos experimentales respecto al control alcohol etílico 70%.

7.2 Concentración de PCA:

Por medio de la curva de calibración y los valores de absorbancia obtenidos en el análisis espectrofotométrico se determinó la concentración de PCA en la etapa posterior a la medicación con CHX al 2%. Dichos valores se exponen en la tabla N°6.

Tabla N°6: Concentraciones de PCA al aplicar CHX al 2% en los 3 grupos de estudio: Alcohol etílico 70%, Alcohol etílico 100% y Alcohol Isopropílico.

	[PCA] _{Máx}	[PCA] _{Mín}	Media	DS
Alcohol etílico 70%	0,0028	0,0014	0,0021	0,0005
Alcohol etílico 100%	0,0022	0,0013	0,0019	0,0003
Alcohol Isopropílico	0,0022	0,0017	0,0020	0,0001

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

En la siguiente tabla (tabla N°7) se comparan los niveles de PCA tras la medicación con CHX 2% de los 3 grupos. Más adelante (Tabla N°8, Tabla N°9 y Tabla N°10) se realiza una comparación alternada entre dos de los distintos grupos experimentales en busca de diferencias estadísticamente significativa entre ellos.

Tabla N°7: Comparación de concentraciones de PCA en los 3 grupos de estudio, luego de la medicación con CHX al 2%.

Paracloroanilina (PCA)

	Grupo Alcohol etílico 70%		Grupo Alcohol etílico 100%		Grupo Alcohol Isopropílico		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
CHX 2%	0,0021	0,0005	0,0019	0,0003	0,0020	0,0001	0,457

DS: Desviación estándar. ***p***: Significancia

Tabla N°8: Comparación de concentraciones de PCA entre el grupo de Alcohol etílico 70% y Alcohol etílico 100% al aplicar medicación de CHX al 2%.

Paracloroanilina (PCA)

	Grupo Alcohol etílico 70%		Grupo Alcohol etílico 100%		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
CHX 2%	0,0021	0,0005	0,0019	0,0003	0,302

DS: Desviación estándar. ***p*:** Significancia

Tabla N°9: Comparación de concentraciones de PCA entre el grupo de Alcohol etílico 70% y Alcohol Isopropílico al aplicar medicación de CHX al 2%.

Paracloroanilina (PCA)

	Grupo Alcohol etílico 70%		Grupo Alcohol Isopropílico		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
CHX 2%	0,00214	0,00052	0,00205	0,00014	0,6017

DS: Desviación estándar. ***p*:** Significancia

Tabla N°10: Comparación de concentraciones de PCA entre el grupo de Alcohol etílico 100% y Alcohol Isopropílico al aplicar medicación con CHX al 2%.

Paracloroanilina (PCA)

	Grupo Alcohol etílico 100%		Grupo Alcohol Isopropílico		Valor <i>p</i>
	Media	DS	Media	DS	
CHX 2%	0,00193	0,00031	0,00205	0,00014	0,3074

DS: Desviación estándar. **p:** Significancia

En el Gráfico N°5 se presenta la comparación de los resultados obtenidos en concentración de PCA formada en los tres grupos de estudio.

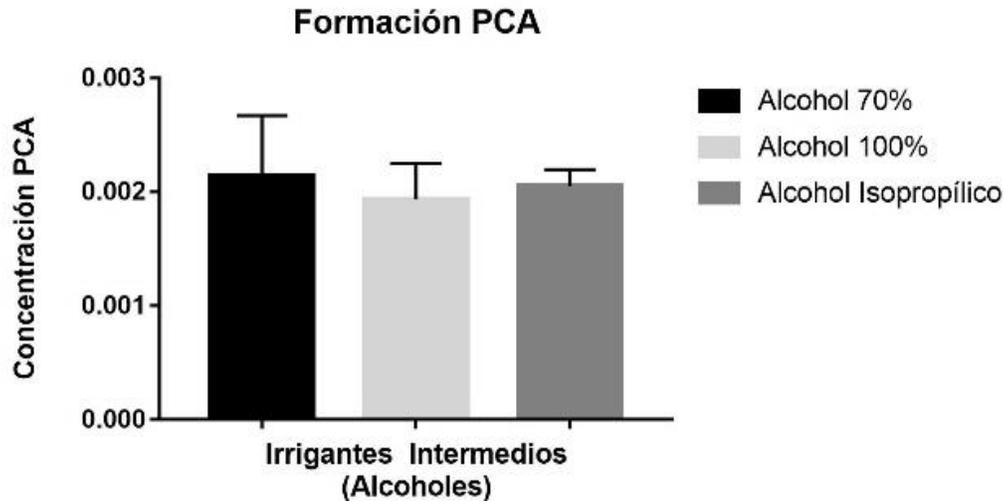


Gráfico N°5: Comparación de concentraciones de PCA formada entre el grupo de alcohol etílico 70%, 100% y alcohol isopropílico al aplicar medicación con CHX 2%.

Luego de realizar las mediciones por medio de espectrofotometría, es posible determinar que la concentración de PCA formada en los grupos experimentales alcohol etílico 100 y alcohol isopropílico puro, no presenta una diferencia significativa respecto del grupo control alcohol etílico 70%.

7.3 Grado de obliteración de los túbulos dentinarios.

Por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) se obtuvieron imágenes de distintas áreas del canal radicular, con las que se pudo comparar el grado de obliteración de los túbulos dentinario presente en cada grupo de estudio (figura N° 19).

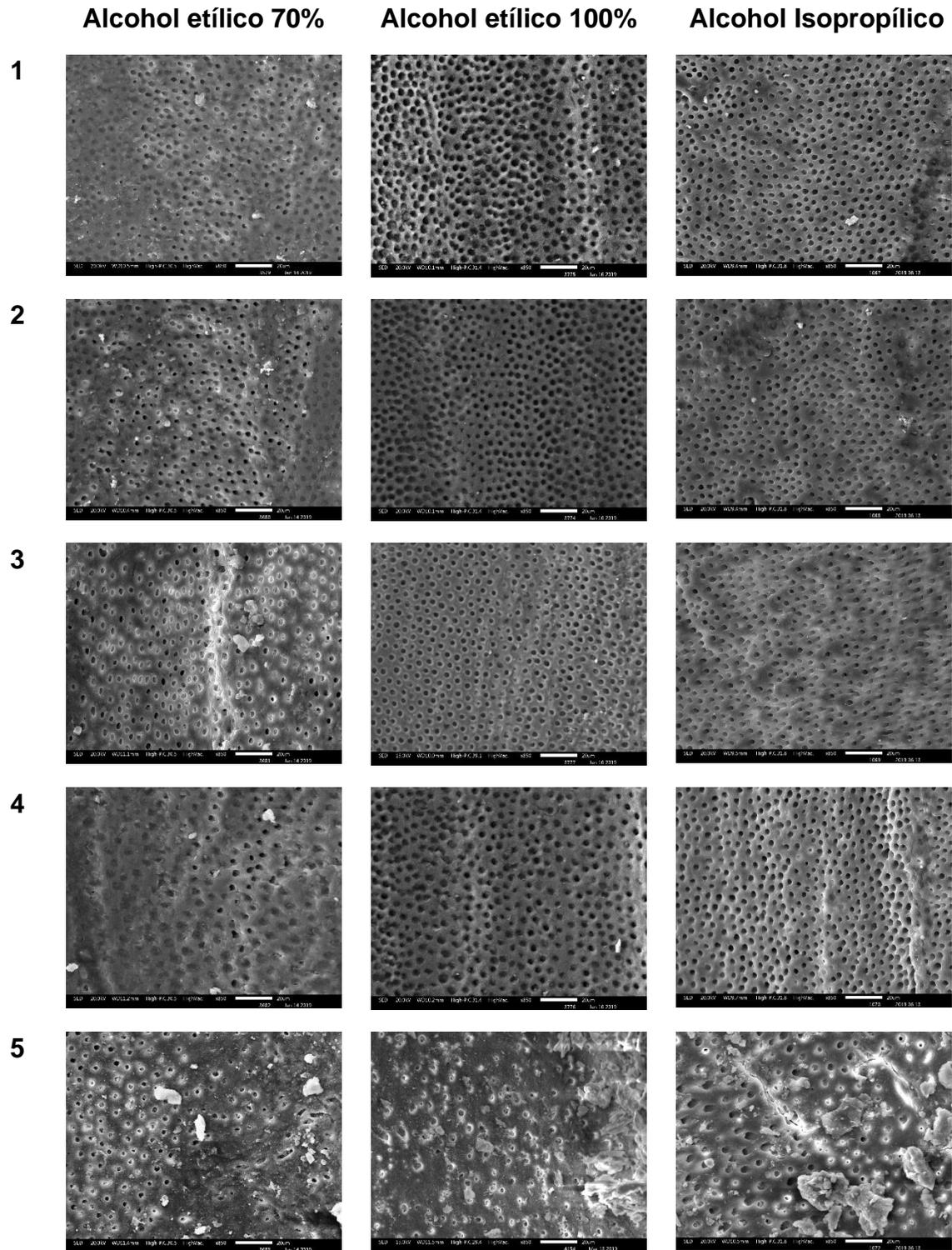


Figura N° 19. Microfotografías: Áreas seleccionadas al dividir longitudinalmente el canal dentinario de cada muestra de estudio en 5 partes. Las imágenes fueron ordenadas de cervical (1) a apical (5) (x850)

Se realizó un conteo y clasificación de los túbulos dentinarios según su grado de obliteración en todas las imágenes obtenidas en formato TIF. Tal conteo fue

organizado por grupo de estudio y se encuentra expuesto de la tabla N°11 a la N°14.

Tabla N° 11: Comparación de grados de obliteración de los túbulos dentinarios en los 3 grupos de estudio con diferentes IRRi.

	Alcohol etílico 70%		Alcohol etílico 100%		Alcohol Isopropílico		Valor p
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
NO	105,40	82,13	126,70	110,58	189,87	137,11	<0,0001*
PO	53,35	41,43	38,86	25,13	26,034	22,63	<0,0001*
TO	64,55	44,04	49,38	36,74	40,20	38,42	0,0002*

NO: No obliterado, **PO:** Parcialmente obliterado, **TO:** Totalmente obliterado, **DS:** Desviación estándar, **p:** Significancia, **(*):** Diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla N° 12: Comparación de grados de obliteración de los túbulos dentinarios en los Alcohol etílico 70% y Alcohol etílico 100%

	Alcohol etílico 70%		Alcohol etílico 100%		Valor p
	Media	DS	Media	DS	
NO	105,40	82,13	126,70	110,58	0,4691
PO	53,35	41,43	38,86	25,13	0,0216*
TO	64,55	44,044	49,38	36,74	0,0182*

NO: No obliterado, **PO:** Parcialmente obliterado, **TO:** Totalmente obliterado, **DS:** Desviación estándar, **p:** Significancia, **(*):** Diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla N° 13: Comparación de grados de obliteración de los túbulos dentinarios en los Alcohol etílico 70% y Alcohol Isopropílico

	Alcohol etílico 70%		Alcohol Isopropílico		Valor p
	Media	DS	Media	DS	

NO	105,40	82,13	189,87	137,11	<0,0001*
PO	53,35	41,43	26,03	22,63	<0,0001*
TO	64,55	44,04	40,20	38,42	<0,0001*

NO: No obliterado, **PO:** Parcialmente obliterado, **TO:** Totalmente obliterado, **DS:** Desviación estándar, **p:** Significancia, **(*):** Diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla N° 14: Comparación de grados de obliteración de los túbulos dentinarios en los Alcohol etílico 100% y Alcohol Isopropílico

	Alcohol etílico 100%		Alcohol Isopropílico		Valor p
	Media	DS	Media	DS	
NO	126,70	110,58	189,87	137,11	0,001*
PO	38,86	25,13	26,034	22,63	<0,0001*
TO	49,38	36,74	40,20	38,42	0,0551

NO: No obliterado, **PO:** Parcialmente obliterado, **TO:** Totalmente obliterado, **DS:** Desviación estándar, **p:** Significancia, **(*):** Diferencia significativa ($p<0,05$).

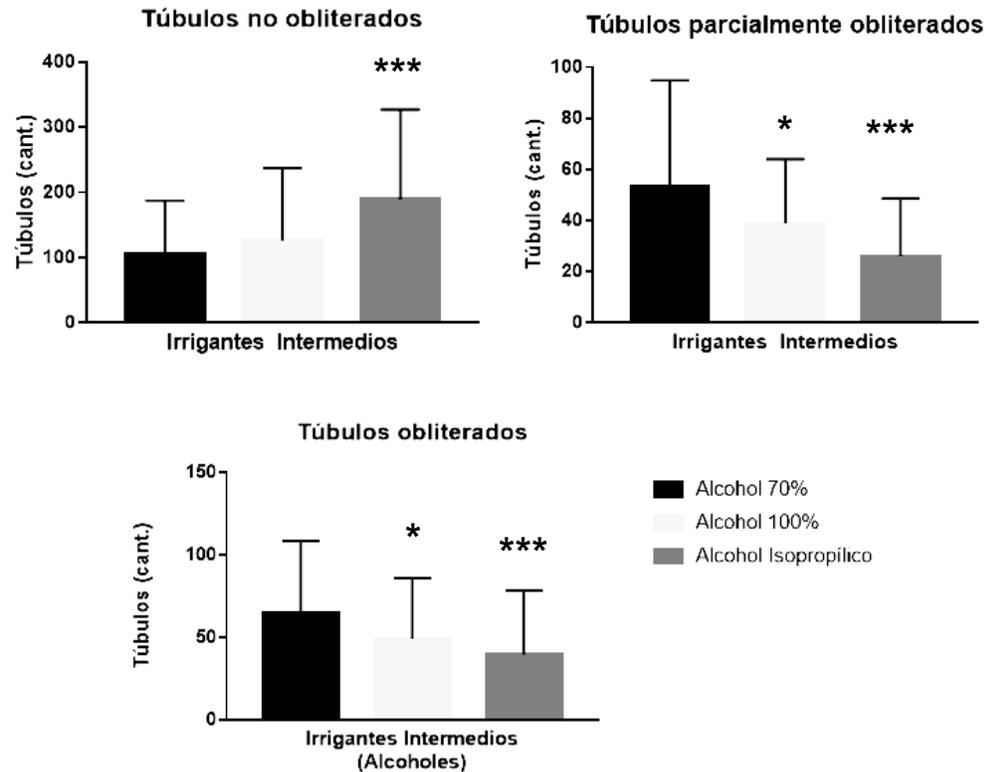


Gráfico N° 6: Comparación de los grados de obliteración de los túbulos dentinarios entre los 3 grupos de estudio según irrigante utilizado. (*): $p < 0,05$, (**): $p < 0,01$

Con los resultados obtenidos se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al comparar la cantidad de túbulos no obliterados, parcialmente obliterados y totalmente obliterados al interior de las paredes del canal dentinario entre los tres grupos de irrigantes intermedios. Comparando los tres grupos de irrigantes intermedios, el grupo con el cual se usó Alcohol Isopropílico al 100% presentó la mayor cantidad de túbulos no ocluidos y la menor de parcialmente ocluidos ($p < 0,05$). El alcohol etílico 100% y alcohol isopropílico mostraron una cantidad significativamente menor de túbulos obliterados en comparación al alcohol etílico 70%.

8. DISCUSIÓN

Durante el abordaje del SCR es necesario asociar la instrumentación con una irrigación con agentes químicos que permitan abarcar las áreas inaccesibles a los medios mecánicos, para remover el *biofilm* y barro dentinario e incluso penetrar en los túbulos dentinarios (Darcey y cols., 2016).

No existe una sustancia que por sí sola cumpla con todo lo que se espera de un irrigante ideal, por lo que para obtener resultados satisfactoriamente predecibles es necesario combinar múltiples irrigantes en una secuencia específica (Haapasalo y cols., 2010). Según lo propuesto por Zehnder y cols. (2006) es recomendable mantener una irrigación abundante con NaClO durante la conformación de los canales radiculares para degradar el tejido orgánico y facilitar la instrumentación, posteriormente una irrigación con EDTA para remover la porción inorgánica del barro dentinario y por último un agente antiséptico como la CHX, que amplía el espectro antimicrobiano y al unirse a las paredes dentinarias mantiene una actividad antimicrobiana prolongada por el fenómeno de sustantividad.

Al combinarse distintos irrigantes remanentes en el interior del canal radicular se generan subproductos que pueden ser tóxicos para los tejidos periapicales y de ser sólidos pueden precipitar obliterando los túbulos dentinarios. Una irrigación intermedia es importante para al menos reducir la formación de subproductos (Prado y cols., 2013).

La combinación de NaClO con CHX potencia importantemente el efecto antibacteriano de la irrigación, sin embargo, ocurre una reacción ácido-base que forma como sal un precipitado café-anaranjado insoluble con presencia de paracloroanilina (PCA) (Basrani y cols., 2007). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IACR) reconoce la PCA como agente potencialmente carcinogénico (OMS, 2006) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera un agente tóxico que en modelos animales ha mostrado que una exposición continua deriva en patologías hematológicas, hepáticas y renales entre otras (OMS, 2003).

La formación de precipitado por la interacción de NaClO y CHX afecta el color de la estructura dentaria y es tóxico para los tejidos periapicales (Bui y cols., 2008;

Akisuey cols., 2010). Además, oblitera los túbulos dentinarios, lo que puede afectar la limpieza y sellado del SCR, y con ello también el éxito del tratamiento (Bui y cols., 2008; Krishnamurthy y Sudhakaran 2010; Gasic y cols., 2012; Mortenson y cols., 2012)

Para controlar la formación de subproductos se ha sugerido utilizar irrigantes intermedios, como agua destilada, suero fisiológico, alcohol etílico 70%, alcohol etílico 100% y alcohol isopropílico (Krishnamurthy y Sudhakaran, 2010; Farías y cols., 2017; Cruz y cols., 2018).

El protocolo de irrigación de la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile sugiere utilizar suero fisiológico (NaCl 0,9%) como irrigante intermedio entre NaClO 5,25% y CHX 2% para disminuir la formación de PCA. Según el estudio de Cruz (2018) el uso de agua destilada como irrigante intermedio es más eficaz que el suero fisiológico y el alcohol etílico 70%, sin embargo, Krishnamurthy y Sudhakaran (2010) señalan que entre el agua destilada, la solución salina y el alcohol isopropílico es este último el único capaz de prevenir la formación de PCA. Farías (2017) por su parte concluye que la utilización de alcohol absoluto como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2% es más efectiva que el suero fisiológico para disminuir la formación de PCA al momento de la medicación intracanal.

Así, dado que el comportamiento de diferentes alcoholes como irrigante intermedio se ha reportado, en el presente estudio se buscó una variación en el grado de obliteración de los túbulos dentinarios al utilizar tres soluciones alcohólicas como irrigantes intermedios entre la irrigación con NaClO al 5% y CHX al 2% mediante microscopía electrónica (SEM).

El recuento de túbulos dentinarios mostró un grado de obliteración tubular considerablemente menor en el grupo de alcohol isopropílico puro respecto a los grupos en los que se usó alcohol etílico 100% y alcohol etílico 70%. Este resultado confirma la hipótesis de este estudio, la cual establece que el uso distintos alcoholes como irrigantes intermedios entre NaClO 5% y CHX 2%, genera distintos grados de obliteración de los túbulos dentinarios.

El análisis de la concentración de NaClO en las 4 fases previas a la primera

irrigación intermedia mostró que en PQM ocurre una leve disminución a 4,37%, 3,97% y 4,34% en los respectivos grupos, sin presentar una diferencia estadísticamente significativa ($p>0,05$). Esta disminución es atribuible a que en contacto con materia orgánica el NaClO se inactiva y además disminuye su concentración, ya que se consumen las moléculas de NaClO involucradas (Stojicic y cols., 2010). Del mismo modo, hubo una disminución de 0,012%, 0,0056% y 0,0069% durante la primera irrigación intermedia (Fase IRRi 1). Durante la segunda fase de irrigación intermedia (IRRI 2) la concentración de NaClO descendió a 0,011%, 0,0057% y 0,0064%. Estos resultados son similares a los descritos por Reyes (2015), Farías (2017) y Cruz (2018).

Se encontró formación de PCA en todos los grupos estudiados, con concentraciones de 0,00214; 0,00193 y 0,00205 en los grupos de alcohol etílico 70%, 100% e isopropílico respectivamente, sin presentar una diferencia significativa ($p<0,05$). Estos resultados son similares a los descritos por Reyes (2015), Farías (2017) y Cruz (2018).

Los tres distintos alcoholes mostraron un comportamiento similar en prevenir la formación de PCA como resultado de la interacción de NaClO 5% y CHX 2%, lo que puede deberse a la similitud de sus propiedades químicas y físicas, donde destaca la importancia de su baja tensión superficial, la que facilita su ingreso a los túbulos dentinarios para disminuir el NaClO residual (Krishnamurthy y Sudhakaran, 2010). Se ha observado que los alcoholes son capaces de penetrar y secar el canal radicular, de modo tal que han comparado su efectividad versus conos de papel y se ha observado que una irrigación final con alcohol permitiría aumentar la penetración de cementos selladores endodónticos a base de óxido de zinc y resinas (Cunningham y cols., 1982; Dias y cols., 2014).

La similar formación de PCA entre los grupos estudiados contrasta con las diferencias encontradas en el grado de obliteración tubular, lo que sugiere que el precipitado observado mediante microscopía electrónica puede no tener una relación directa con la formación de PCA. A pesar de que algunos estudios señalan que el precipitado formado en la interacción de NaClO con CHX contiene PCA (Basrani y cols., 2007; Bui y cols., 2008; Mortenson y cols., 2012; Kolosowski y cols.,

2014; Arslan y cols., 2015), existen otros en los que se afirma que ese precipitado no lo contiene (Thomas y Sem, 2009; Prado y cols., 2013; Orhan y Cols., 2016).

Prado y cols. (2013) estudiaron los subproductos formados tras la interacción de irrigantes comúnmente usados en endodoncia. Describen una interacción entre el alcohol etílico y la CHX de la cual se forma un precipitado salino debido a la reducción de la solubilidad de la sal de CHX en alcohol. Es posible, también, que el precipitado observado en el presente estudio esté relacionado a la interacción no entre NaClO y CHX, sino entre los irrigantes intermedios propuestos (alcoholes) y la CHX. Por otro lado, se ha descrito la generación espontánea de PCA a partir de CHX (Basrani y cols., 2007). Es necesario realizar más estudios para aclarar la relación entre la PCA formada en el canal radicular durante el tratamiento endodóntico con el precipitado visible a través de microscopía electrónica de barrido.

La presencia de PCA en el grupo en el que se usó Alcohol Isopropílico contrasta con los resultados de Krishnamurthy y Sudhakaran (2010), quienes determinaron que el alcohol isopropílico es capaz de prevenir su formación. Esta diferencia en los resultados puede deberse a que en tal estudio utilizaron NaClO a una concentración de 2,5% y a que sus observaciones se realizaron mediante estereomicroscopía.

Un buen sellado del sistema de canales radiculares es crucial para el éxito del tratamiento endodóntico. Khayat y cols. (2005) afirman que, a mayor permeabilidad en las paredes del canal radicular, disminuye significativamente la microfiltración en canales obturados con cementos en base a eugenato de zinc (Roth 801) y resina (AH26). Según Homayouni y cols. (2014) el precipitado formado tras la interacción de NaClO con CHX tiene un efecto negativo en la habilidad selladora al utilizarse gutapercha y cemento en base a resina como AH26. El metaanálisis realizado por Shahravan y cols., (2007) concluye que la remoción del barro dentinario mejora significativamente el sellado del sistema de canales radiculares, mientras que tanto la técnica de obturación como el cemento sellador no tienen un impacto de la misma significancia.

El presente estudio demostró que el uso de Alcohol Isopropílico disminuye

importantemente el grado de obliteración tubular en comparación al Alcohol etílico 70% y Alcohol etílico 100%, y potencialmente favorecería un óptimo sellado del sistema de canales radiculares. Sin embargo, no existen estudios suficientes para asegurar su biocompatibilidad con los tejidos periapicales. Según el estudio *in vitro* de Orstavik y Pitt (2007) una muestra de NaClO al 1% es cuatro veces más citotóxica que el Alcohol etílico 100%, mientras que según Sánchez (2005) el Alcohol Isopropílico es más irritante que el Alcohol etílico .

Una limitación de este estudio es haber sido realizado bajo un modelo experimental *ex vivo*. No es posible replicar el uso de los irrigantes propuestos en estudios clínicos con pacientes hasta llevar a cabo estudios de biocompatibilidad. Por otro lado, los tejidos orgánicos encontrados en los dientes extraídos presentan un importante deterioro respecto a los que se encuentran en un paciente real y no representan la fisiología de una pulpa y/o tejido periapical en un tratamiento endodóntico.

Finalmente, el presente trabajo indica que el uso de Alcohol etílico 70%, Alcohol etílico 100% o Alcohol Isopropílico como irrigante intermedio entre NaClO 5% y CHX 2% no impide la formación de PCA. Sin embargo, hace variar el grado de obliteración tubular en favor del Alcohol Isopropílico, lo que podría influir en la desinfección y la calidad del sellado endodóntico.

Es recomendable dilucidar los efectos biológicos que produce el Alcohol Isopropílico en los tejidos periapicales, así como también se requieren futuros estudios que comparen el efecto preventivo en la formación de precipitado entre el Alcohol Isopropílico y el Agua destilada, que según Cruz (2018) resulta más efectivo que el Suero Fisiológico (NaCl 0,9%) y que el Alcohol etílico 70%.

9. Conclusiones

- 1) El Alcohol Isopropílico permite mayor número de túbulos no obliterados, un menor número de túbulos parcialmente obliterados y un menor número de túbulos totalmente obliterados al compararse con Alcohol etílico 70%.
- 2) El Alcohol Isopropílico permite un mayor número de túbulos no obliterados, un menor número de túbulos parcialmente obliterados y un número similar de túbulos totalmente obliterados comparado al Alcohol etílico 100%.
- 3) El Alcohol etílico 100% permite obtener un menor número de túbulos dentinarios parcial y totalmente obliterados en comparación con el Alcohol etílico 70%.
- 4) El uso de alcoholes como alcohol etílico 70%, alcohol etílico 100% o alcohol isopropílico 100% como irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y la medicación con CHX al 2% afectan de manera similar entre ellos la formación de PCA.

10.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.
- Arslan H, Uygun A. D., Keskin A, Karatas E, Seckin F, Yildirim A (2015). Evaluation of orange-brown precipitate formed in root canals after irrigation with chlorhexidine and QMix and spectroscopic analysis of precipitates produced by a mixture of chlorhexidine/NaOCl and QMix/NaOCl. *Int Endod J* 48: 1199–1203. Arslan y cols., 2015
- Barbin LE, Estrela C, Guedes DF, Spanó JC, Sousa-Neto MD, Pécora JD (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. *J Endod* 39:664-668.
- 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.
- Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2008). Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 39(1):10-7
- Boehncke A, Kielhorn J, Könnecker G, Pohlenz-Michel C, and Mangelsdorf I, (2003). 4-CHLOROANILINE. *Concise International Chemical Assessment Documents*, 48.
- Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC (2008). Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod* 34(2):181-5.
- Calt S, Serper A (2002). Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J*

Endod 28(1):17-9.

Chang, R. (2011). *Fundamentos de química*. México: McGraw-Hill.

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.

Cruz Lathrop, Fuenzalida Muñoz, Yévenes López, Ruiz Nolf, and Universidad De Chile. Facultad De Odontología. 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. Santiago, 2018. Print.

Cunningham, W. T., Martin, H., & Forrest, W. R. (1982). Evaluation of root canal debridement by the endosonic ultrasonic synergistic system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 53(4), 401-404

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

Dias, K., Soares, C., Steier, L., Versiani, M., Abi Rached-Júnior, F., & Pécora, J. et al. (2014). Influence of Drying Protocol with Isopropyl Alcohol on the Bond Strength of Resin-based Sealers to the Root Dentin. *J Endod*, 40 (9), 1454-1458.

Dunavant T., Regan J., Glickman G., Solomon E., Holleyman A. (2006). Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*, 32(6): 527–531

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 13(2):113-7.

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>

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).

- 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.
- Giardino L., Ambu E., Savoli E., Rimondini R., Cassanelli C., Debbia E. (2007). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 33(7): 852–855
- Goldman M, Goldman L, Cavaleri R, Bogis J, Sun Lin P. (1982). The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: part 2. *Journal of Endodontics* 8(11):487-492.
- 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.
- 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
- Haapasalo, M., Shen, Y., Qian, W., & Gao, Y. (2010). Irrigation in endodontics. *Dental Clinics of North America*, 54(2), 291-312
- Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. (2014) Irrigation in endodontics. *British Dental Journal.* 216(6):299-303.
- Homayouni H, Majd NM, 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. *Open Dent J.* 22; 8: 184-7.
- 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.
- Kolosowski KP, Sodhi RN, Kishen A, Basrani BR. (2014). Qualitative analysis of precipitate formation on the surface and in the tubules of dentin irrigated with sodium hypochlorite and a final rinse of chlorhexidine or QMiX. *J Endod*. 40(12):2036-40
- Krishnamurthy S., Sudhakaran S (2010). Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* 36(7): 1153-1157.
- Mohammadi Z, Khademi AA, Davari AR. (2008) Evaluation of the antibacterial substantivity of three concentrations of chlorhexidine in bovine root dentine. *Iran Endod J* 2, 113–25.
- Mohammadi & Abbott (2009). The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 42(4): 288-302
- Mohammadi Z., Jafarzadeh H., Shalavi S. (2014). Antimicrobial efficacy of chlorhexidine as a root canal irrigant: a literatúra review. *J Oral Sci* 56, 99-103
- Mortenson, D., Sadilek, M., Flake, N., Paranjpe, A., Heling, I., Johnson, J., & 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. *Int Endod J*, 45(9), 878-882.
- Orhan E, Irmak Ö, Hür D, Yaman B, Karabucak B. (2016) Does Para-chloroaniline Really Form after Mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine?. *J Endod* :1–5
- 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
- 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 etílico 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.

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

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.

Stojcic, 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.

Thomas J., Sem D. (2010) An In Vitro Spectroscopic Analysis to Determine Whether Para-Chloroaniline Is Produced from Mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. *J Endod* 36:315–317

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.

11.ANEXOS

11.1 ANEXO 1

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO TOMA DE MUESTRAS DENTARIAS PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE DIFERENTES SOLUCIONES ALCOHÓLICAS SOBRE LAS PAREDES DEL CANAL RADICULAR Y EN LA FORMACIÓN DE PARACLOROANILINA (PCA) AL SER USADAS COMO IRRIGANTES INTERMEDIOS ENTRE HIPOCLORITO DE SODIO 5% Y CLORHEXIDINA 2%. ANÁLISIS QUÍMICO Y MICROSCÓPICO. ESTUDIO *EX VIVO*.

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

Anselmo Valdivia Martínez, 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 del Dr. Mauricio Ruiz Nolf, 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, podrá preguntarle al alumno responsable (Nombre: Anselmo Valdivia Martínez; Celular: 85937706).

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

11.2 ANEXO 2

PROTOCOLO DE IRRIGACIÓN MODIFICADO PARA ALCOHOLES

1. **Cavidad de acceso:** Realizar 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 cortar con fresas de carburo-tungsteno redondas de baja velocidad de acuerdo a la anatomía del diente hasta realizar la comunicación con la cámara pulpar. Tras lograr la comunicación con la cámara pulpar, se debe irrigar con NaClO al 5% con Jeringa Irrigación Monoject 3mL + Aguja (27x1 1/4). Continuar con el destechamiento de la cámara pulpar, 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, realizar 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%. **Toma de recolección N°1.**

Luego realizar 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 del canal (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 es 3-2-1, para canales medios es 1-2-1 y para canales finos debe realizarse un pre-flare con limas manuales y posteriormente la secuencia 1-2-1 irrigando con NaClO al 5%. **Toma de recolección N° 2.**

3. **Determinación Longitud de Trabajo (LT):** Introducir la lima hasta que se visualice la punta de ésta a través del foramen apical. Se debe dejar la punta de la lima al ras del foramen y definir esa longitud como la longitud real del diente (LRD). Definir la longitud de trabajo (LT) a -1mm de la LRD.
4. **Preparación 1/3 Apical:** Instrumentar hasta Lima Maestra (LM) irrigando con NaClO al 5% entre cada paso de lima. **Toma de recolección N°3.**
5. **Retroceso (Step-Back):** Instrumentar 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. **Toma de recolección N°4.**
6. Secado del canal radicular con conos de papel.
7. Irrigación (IRR) con alcohol etílico 70%. Irrigar con 3 jeringas de 3 mL cada una. **Toma de 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. **Toma de recolección N°8.**
10. Secado del canal radicular con conos de papel.
11. IRR con alcohol etílico 70%. Irrigar con 3 jeringas de 3 mL cada una. **Toma de recolección N°9, 10 y 11.**
12. Secado del canal radicular con conos de papel.

11.3 ANEXO 3

DISPOSITIVO PARA TOMA DE MUESTRAS

El dispositivo para toma de muestras fue creado, diseñado y construido 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.

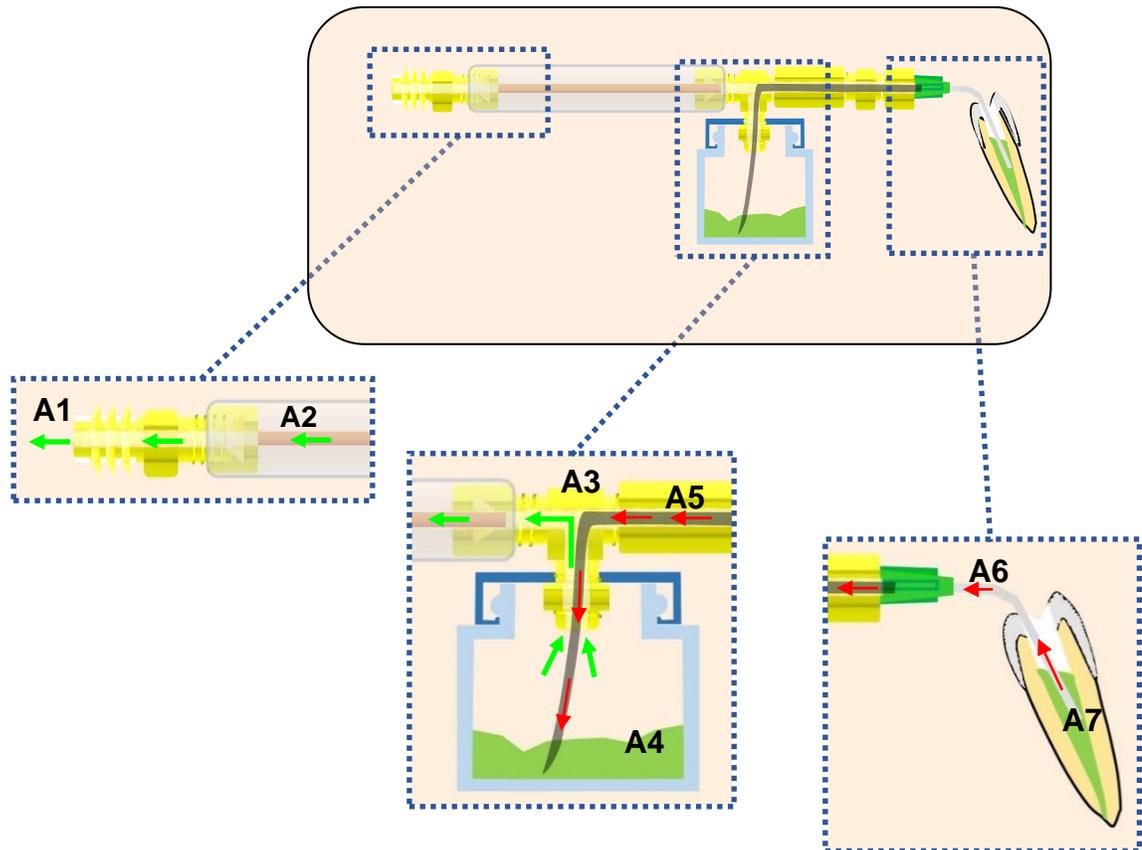


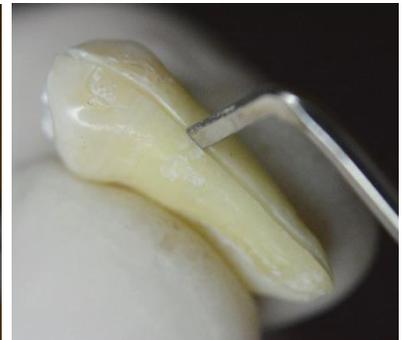
Figura A. Dispositivo para toma de muestras fabricado por Dr. Mauricio Ruiz N.

11.4 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. B*) y en sentido vestibulo-palatino (*abajo, fig. C*). Mediante una hachuela de esmalte (15-8-12, HuFriedy) provocar la fractura longitudinal (*abajo, fig. D*).

**B****C****D**

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



11.5 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: Poner las muestras en el secador de punto crítico (AUTOSAMDRI-815, SERIES A OVERVIEW) durante 45 minutos, donde cada muestra es secada para remover las moléculas de agua a través de CO₂.
3. Etapa de Metalizado con oro: Una vez secas las muestras, se deben montar en porta muestras de aluminio para posteriormente ser metalizadas con oro en METALIZADOR DENTON VACUMM DESK V.
4. Almacenar en cápsulas Petri hasta su utilización.

11.6 ANEXO 6

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 por diente. El área del canal a evaluar comprenderá desde el límite amelo-cementario (LAC) hasta aproximadamente el área CDC.
3. Realizar el recuento sobre imágenes en formato TIF aumentadas x850 y una rejilla con 5x5 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% o 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.

