

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE HOJAS DE *Azadirachta indica* (NEEM) PARA SU USO  
COMO IRRIGANTE EN ENDODONCIA**

**TRABAJO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

**PRESENTA**

C.D. DALIA MONSERRAT RODRÍGUEZ ALFARO

**PRESIDENTE**

DR. JULIO CÉSAR GARCÍA BRIONES

**SINODAL**

DRA. MARÍA DE LOS REMEDIOS  
SÁNCHEZ DÍAZ

**SINODAL**

DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO  
GUTIÉRREZ

**SINODAL**

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

**“2022, año de la erradicación de la violencia contra las mujeres en Baja California”**

Tijuana, Baja California a, 6 de junio de 2022

**AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Azadirachta indica* (NEEM) PARA SU USO COMO IRRIGANTE EN ENDODONCIA.**

Propuesto por la C.D. DALIA MONSERRAT RODRÍGUEZ ALFARO, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE**



**DR. JULIO CÉSAR GARCÍA BRIONES**  
PRESIDENTE

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**  
"2022, año de la erradicación de la violencia contra las mujeres en Baja California"

Tijuana, Baja California a, 6 de junio de 2022

**AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Azadirachta indica* (NEEM) PARA SU USO COMO IRRIGANTE EN ENDODONCIA.**

Propuesto por la C.D. DALIA MONSERRAT RODRÍGUEZ ALFARO, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE**

  
**DRA. MARÍA DE LOS REMEDIOS SÁNCHEZ DÍAZ**  
SINODAL

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**  
"2022, año de la erradicación de la violencia contra las mujeres en Baja California"

Tijuana, Baja California a, 6 de junio de 2022

**AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Azadirachta indica* (NEEM) PARA SU USO COMO IRRIGANTE EN ENDODONCIA**

Propuesto por la C.D. DALIA MONSERRAT RODRÍGUEZ ALFARO, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE**

  
**DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO GUTIÉRREZ**  
SINODAL

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

**“2022, año de la erradicación de la violencia contra las mujeres en Baja California”**

Tijuana, Baja California a, 6 de junio de 2022

**AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Azadirachta indica* (NEEM) PARA SU USO COMO IRRIGANTE EN ENDODONCIA**

Propuesto por la C.D. DALIA MONSERRAT RODRÍGUEZ ALFARO, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE**



**DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ**  
SINODAL

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE HOJAS DE *Azadirachta indica* (NEEM) PARA SU USO  
COMO IRRIGANTE EN ENDODONCIA**

**PRESENTA**

---

C.D. DALIA MONSERRAT RODRÍGUEZ ALFARO

**PRESIDENTE**

---

DR. JULIO CÉSAR GARCÍA BRIONES

**SINODALES**

---

DRA. MARÍA DE LOS REMEDIOS  
SÁNCHEZ DÍAZ

---

DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO  
GUTIÉRREZ

---

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

Tijuana, Baja California, junio de 2022

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios por darme salud, por acompañarme siempre y permitirme cumplir esta meta.

A la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez por darme la oportunidad de ingresar a este posgrado.

Al Dr. Miguel Ángel Ramírez por su apoyo, disposición, por su paciencia y presencia.

A mi director de tesis, el Dr. Julio Cesar García Briones, a mis sinodales, la Dra. Eva Viviana Sarmiento Gutiérrez por darme la pauta para comenzar este tema, y en especial, a la Dra. María de los Remedios Sánchez Díaz por brindarme su tiempo, su asesoramiento, siempre dispuesta a ayudarme y resolver mis dudas, agradezco también sus llamadas de atención, indudablemente, es un gran ser humano, del que he aprendido mucho. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Eustolia Rodríguez por asesorarme y ayudarme con la toma de decisiones y redacción de mi tesis.

Al Dr. Edgar Ramiro Méndez Sánchez por su colaboración en el procesamiento y captura de los resultados microscópicos.

Al Dr. Ganesh Natarajam, por su amabilidad y confianza, por contestar todas mis llamadas y encontrarme cuando estaba perdida.

A mis amigos de vida, Lenika, Tania, Gaby y Joel, por su apoyo, por sus consejos, por darme fortaleza y por estar presente en todo momento.

A Jacky, su amistad incondicional, es el mejor regalo que me dejó este posgrado.

A mi familia, a mis padres por su apoyo, por los valores y principios que me inculcaron.

A mi hermana, por creer siempre en mí, por su inmenso apoyo a cada paso que doy desde que éramos niñas, y sobre todo por cuidar de mi hija como si fuese la suya.

A mi hija, por sobrellevar estos años de formación sin su mamá. Sé que le hice falta, sin embargo, ¡lo hizo muy bien!

### **Agradecimientos institucionales**

A CONACyT por la beca otorgada con el número (CVU): 1082615.

A la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme continuar mis estudios de posgrado siendo cimarrón.

**CONTENIDO**

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>i</b>
<b>Agradecimientos institucionales.....</b>	<b>ii</b>
<b>CONTENIDO .....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. ENDODONCIA.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. COMPLEJO PULPODENTINARIO.....</b>	<b>2</b>
<b>2.3 LOS TEJIDOS PERIRRADICULARES.....</b>	<b>3</b>
<b>2.4. TRIADA ENDODÓNTICA .....</b>	<b>4</b>
2.4.1. Instrumentación.....	4
2.4.2. Obturación.....	5
2.4.3. Irrigación .....	6
<b>2.5. IRRIGANTES EN ENDODONCIA.....</b>	<b>7</b>
2.5.1. Hipoclorito de sodio.....	7

2.5.2. Clorhexidina .....	8
2.5.3. Agentes de descalcificación o quelantes .....	10
2.5.3.2. Ácido etilendiaminotetracético .....	11
2.5.3.3. Ácido etidróico.....	13
2.5.3.4. Biopure MTAD y Tetraclean .....	13
2.5.3.5. QMix.....	14
2.5.4. <i>Azadirachta indica</i> .....	15
2.5.4.1. Generalidades.....	15
2.5.4.2. <i>Azadirachta indica</i> en odontología .....	18
2.5.4.3. <i>Azadirachta indica</i> como medicación intraconducto.....	19
2.5.4.4. <i>Azadirachta indica</i> como irrigante del conducto radicular .....	20
2.5.4.4. Citotoxicidad de <i>Azadirachta indica</i> .....	21
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>24</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>V. HIPÓTESIS .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2. HIPÓTESIS NULA .....</b>	<b>26</b>
<b>5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>VI. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>6.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>27</b>
<b>6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>27</b>
<b>VII. VARIABLES .....</b>	<b>28</b>

<b>7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES .....</b>	<b>28</b>
<b>7.2. VARIABLES DEPENDIENTES.....</b>	<b>28</b>
<b>7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES .....</b>	<b>28</b>
<b>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>8.1. TIPO DE ESTUDIO .....</b>	<b>29</b>
<b>8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO.....</b>	<b>29</b>
<b>8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL .....</b>	<b>29</b>
<b>8.4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>29</b>
8.4.1. MACERACIÓN DEL NEEM.....	29
8.4.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.....	32
<b>8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>43</b>
<b>IX. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>9.1. Análisis visual .....</b>	<b>45</b>
<b>9.2. Análisis microscópico .....</b>	<b>46</b>
9.2.1. Comparación de las observaciones microscópicas del extracto etanólico de Neem y el NaOCl al 5.25% .....	52
<b>9.3. Análisis espectrofotométrico y estadístico .....</b>	<b>54</b>
<b>X. DISCUSIÓN .....</b>	<b>58</b>
<b>XI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>XII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>63</b>

**XIII. BIBLIOGRAFÍA .....64**

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tejido pulpar y perirradicular .....	3
Figura 2. Limas rotatorias Protaper Gold .....	5
Figura 3. Obturación del sistema de conductos radiculares de un molar inferior ....	6
Figura 4. Lesiones ocasionadas por extrusión de NaOCl .....	8
Figura 5. Estructura química de gluconato de Clorhexidina (CHX) .....	9
Figura 6. Penetración de irrigantes en los túbulos dentinarios .....	11
Figura 7. Estructura química y solución quelante, EDTA 18% .....	12
Figura 8. Erosión dentinaria producida por EDTA/NaOCl .....	13
Figura 9. Recipiente con Biopure MTAD .....	14
Figura 10. QMix.....	15
Figura 11. Planta de Neem (Azadirachta indica) .....	16
Figura 12. Técnica de elaboración del extracto de la hoja de Neem.....	21
Figura 13. Hoja de Neem .....	30
Figura 14. Pesaje de las hojas de Neem.....	30
Figura 15. Solutos y solventes .....	31
Figura 16. Maceración del Neem .....	31
Figura 17. Rotulación de la preparación.....	32
Figura 18. Muestra sanguínea.....	33
Figura 19. Centrifuga.....	33
Figura 20. Glóbulos rojos centrifugados.....	34
Figura 21. Glóbulos rojos lavados .....	35
Figura 22. Eritrocitos al 4% .....	36
Figura 23. Muestras de Eritrocitos.....	37
Figura 24. Soluciones de prueba.....	38
Figura 25. Extracto etanólico de Neem .....	39
Figura 26. Proceso de pipeteo .....	40
Figura 27. Distribución de las soluciones .....	41
Figura 28. Placa de 96 pocillos lista para leerse en el lector multipozo. ....	42
Figura 29. Lector de microplaca .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 30. Microscopio óptico.....	43
Figura 31. Placa de 96 pocillos .....	45
Figura 32. Placa de 96 pocillos vista contra la luz.....	46
Figura 33. Solución salina / Glóbulos rojos .....	46
Figura 34. Agua destilada / Glóbulos rojos.....	47
Figura 35. Extracto etanólico de Neem 1:1 / Glóbulos rojos .....	48
Figura 36. Extracto etanólico de Neem 1:8 / Glóbulos rojos .....	48
Figura 37. Extracto etanólico de Neem 1:256 / Glóbulos rojos .....	49
Figura 38. NaOCl al 5.25% 1:1/ Glóbulos rojos.....	50
Figura 39. NaOCl al 5.25% 1:8 / Glóbulos rojos.....	50
Figura 40. NaOCl al 5.25% 1:256 / Glóbulos rojos.....	51
Figura 41. Extracto etanólico de Neem 1:1 .....	52
Figura 42. Dilución de 1:1. ....	53
Figura 43. Dilución de 1:8 .....	53
Figura 44. Dilución de 1:256.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del Neem .....	16
Tabla 2. Taxonomía biológica del Neem .....	17
Tabla 3. Actividad biológica de los compuestos químicos del Neem .....	18
Tabla 4. Media con desviación estándar .....	55

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Viabilidad celular de células Jurkat frente extractos herbales contra Enterococcus faecalis. ....	22
Gráfica 2. Hemoglobina corpuscular media en glóbulos rojos.....	23
Gráfica 3. Actividad hemolítica inmediata .....	55
Gráfica 4. Actividad hemolítica a las 24 horas.....	56
Gráfica 5. Comparación de la absorbancia del extracto de Neem contra el NaOCl al 5.25% .....	56
Gráfica 6. Absorbancia de todos los grupos.....	57

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CHX</b>	Clorhexidina
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetrácetico
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Hierro
<b>g</b>	Gramos
<b>GP</b>	Gutapercha
<b>MEB</b>	Microscopia Electrónica de Barrido
<b>mg</b>	Miligramos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>NaOCl</b>	Hipoclorito de sodio
<b>NiTi</b>	Níquel Titanio
<b>PCA</b>	Paracloroanilina
<b>pH</b>	Medida de acidez o alcalinidad
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>V</b>	Volts
<b>µL</b>	Microlitros

## I. RESUMEN

**Introducción:** El irrigante de elección en el tratamiento de conductos radiculares desde hace muchos años, por su gran actividad antimicrobiana, ha sido el hipoclorito de sodio (NaOCl), sin embargo, el efecto citotóxico que produce al estar en contacto con los tejidos periapicales ha llevado a la búsqueda de otras alternativas, tal es el caso del estudio de plantas medicinales como la *Azadirachta indica*, también conocida como Neem que posee una actividad antimicrobiana similar. **Objetivo:** Evaluar la citotoxicidad del extracto etanólico de Neem, como irrigante endodóntico, midiendo la actividad hemolítica en eritrocitos humanos y comparando dicha actividad con la solución de NaOCl al 5.25%. **Materiales y métodos:** En una microplaca de 96 pocillos, se colocaron 100  $\mu$ L del extracto etanólico de Neem y se realizó una dilución en serie, en la fila correspondiente y por triplicado en 100  $\mu$ L de solución salina. Finalmente, a cada pocillo se adicionaron 100  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos al 4%. De la misma manera se realizó con el NaOCl al 5.25%. Al término de la experimentación y a las 24 hrs se midió la absorbancia a 430 a 600 nm, en un lector multipozo, las muestras se observaron en un microscopio óptico y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando Análisis de Varianza ANOVA bidireccional. **Resultados:** En el análisis visual y microscópico se pudo observar una diferencia cualitativa respecto a la destrucción de eritrocitos con un menor grado de hemolisis a partir de la dilución 1:8, comparado con el NaOCl al 5.25% que provocó la decoloración y destrucción total de las células sanguíneas hasta en la dilución más baja de 1:256. Por densidad óptica se demostró que no hubo una diferencia significativa entre el extracto etanólico de Neem y el NaOCl al 5.25% en cuanto a turbidez. Estadísticamente las diluciones de 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 mostraron diferencia estadísticamente significativa. **Conclusión:** El extracto etanólico de Neem y el NaOCl al 5.25% tienen un efecto similar.

## **II. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. ENDODONCIA**

La Endodoncia es una especialidad de la odontología, reconocida como tal por la Asociación Dental Americana en 1963, que estudia la estructura, morfología y fisiología de las cavidades dentarias coronal y radicular que contienen a la pulpa dental y a su vez, trata la patología del complejo dentino-pulpar y de la región periapical (1).

Su estudio y práctica abarcan las ciencias básicas y clínicas, incluida la biología de la pulpa normal, la etiología, diagnóstico, prevención y tratamiento (2).

El tratamiento endodóntico se dirige principalmente a un objetivo: curar o prevenir la periodontitis perirradicular, eliminando los tejidos blandos y duros infectados, para proporcionar acceso a las soluciones de irrigación y desinfección hasta la zona apical, crear espacio para la colocación de medicamentos y la subsiguiente obturación, así como, conservar la integridad de las estructuras radiculares; con la finalidad de que los pacientes puedan conservar sus dientes naturales tanto en función como en estética (2).

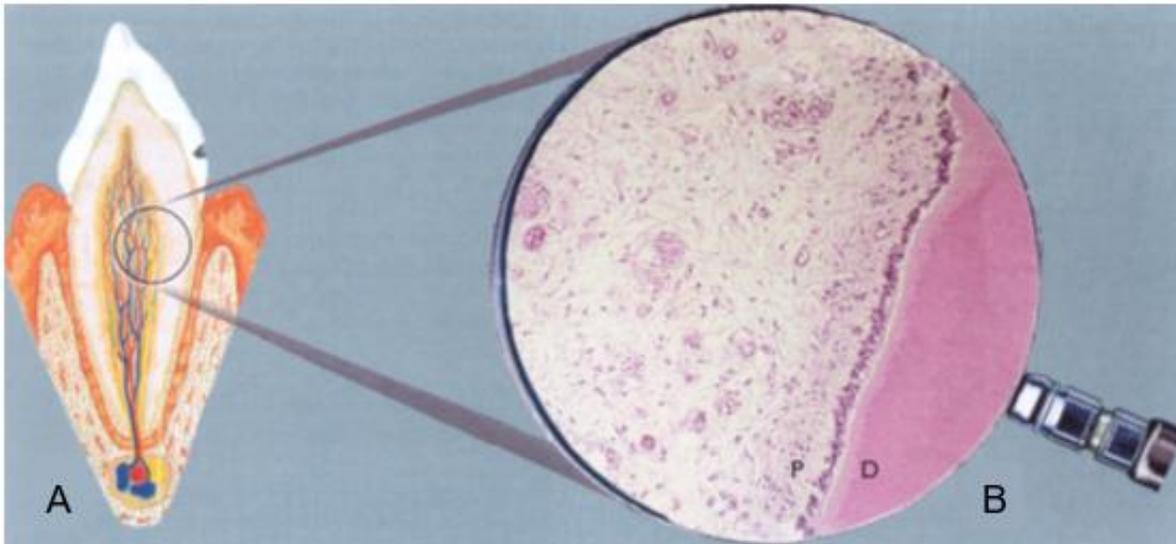
### **2.2. COMPLEJO PULPODENTINARIO**

La pulpa es un tejido conjuntivo laxo de características especiales, que mantiene relación íntima con la dentina, que rodea y con la que constituye una unidad funcional denominada complejo pulpodentinario (Figura 1). La pulpa que ocupa la cavidad central del diente, cámara pulpar y conducto radicular, se comunica con el ligamento periodontal a través del foramen apical o de foraminas apicales, inclusive por eventuales conductos laterales, por los que pasan los elementos vasculares y nerviosos. Su contenido consiste en células como fibroblastos, macrófagos y linfocitos, fibras colágenas y reticulares, sustancia fundamental amorfa, líquido tisular, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (3).

En la superficie de la pulpa se encuentran células altamente especializadas: los odontoblastos. Estos son los encargados de producir la dentina y los túbulos dentinarios de manera permanente; la presencia en estos últimos hace de la dentina un tejido vivo y sensible; ello habilita a la pulpa para reaccionar y protegerse de los agentes agresores, así como para compensar en parte las pérdidas de esmalte o de dentina (3,4).

### 2.3 LOS TEJIDOS PERIRRADICULARES

El periodonto de inserción es el aparato de sostén del diente en el alveolo y está constituido por cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar fasciculado (lamina dura) (Figura 1). Estos tejidos, originados del mismo componente embrionario, el folículo o saco dental, conforman una unidad funcional mantenida, en el diente adulto, por la actividad metabólica del ligamento periodontal. Este complejo tisular, en la región del ápice radicular o periápice, se denomina tejido periapical (3).



*Figura 1. Tejido pulpar y perirradicular*

**A) Esquema demostrativo de la relación de la pulpa con la dentina que la circunda y con los tejidos perirradiculares, a través de los forámenes apical y lateral. B) Microfotografía del complejo dentino-pulpar (3).**

## **2.4. TRIADA ENDODÓNTICA**

La triada endodóntica consistente en la instrumentación y conformación, irrigación y desinfección, así como la obturación del sistema de conductos radiculares, son los pasos principales involucrados en el tratamiento de los dientes con enfermedades pulpares y periapicales. La eliminación o reducción significativa de irritantes y la prevención de la recontaminación del conducto radicular después del tratamiento son los elementos esenciales para obtener resultados exitosos. Aunque se han hecho muchos avances en los diferentes aspectos de la endodoncia en los últimos años para preservar la dentición natural, el objetivo principal de este campo sigue siendo la eliminación de microorganismos de los sistemas del conducto radicular y la prevención de la recontaminación después del tratamiento (2).

### **2.4.1. Instrumentación**

La conformación del conducto radicular debe incluir de forma completa y centrada los conductos originales en la preparación, así como también, conservar la mayor cantidad posible de dentina radicular para no debilitar la estructura de la raíz y prevenir las fracturas radiculares, ya que el enderezamiento de los conductos puede conducir a un adelgazamiento del grosor de las paredes precurvadas (2).

Existen diferentes instrumentos endodónticos con los que se puede llevar a cabo la conformación del sistema de conductos radiculares, estos pueden ser: instrumentos de acción manual, motorizados de acero inoxidable o níquel titanio (NiTi) (Figura 2), los cuales varían sustancialmente del diseño, conicidad, aleación utilizada y movimiento de corte.



*Figura 2. Limas rotatorias Protaper Gold*

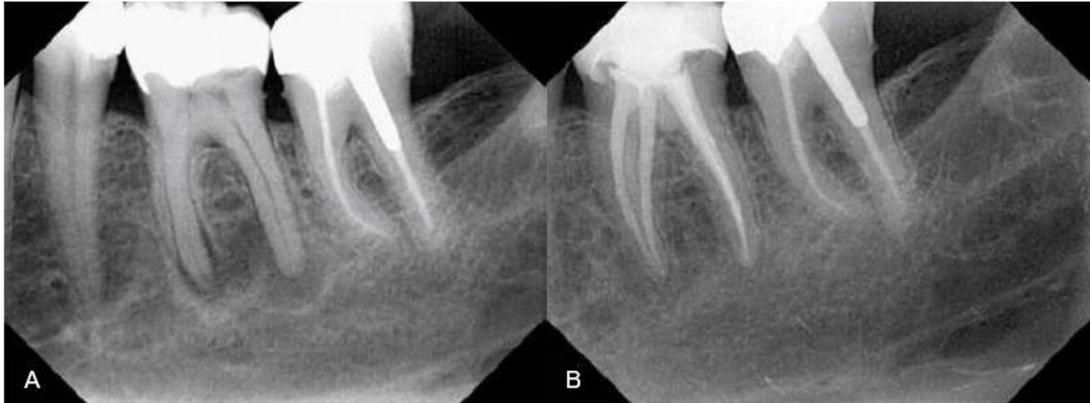
**Fotografía representativa de limas rotatorias Protaper Gold para limpieza y conformación del sistema de conductos radiculares de la casa comercial Dentsply Sirona (5).**

Se ha señalado que los conductos deben prepararse con una conicidad uniforme y continua para facilitar la obturación y crear el espacio para el uso de irrigantes (6).

#### **2.4.2. Obturación**

La obturación refleja la limpieza y conformación, y en ella se evalúan la longitud, la conicidad, la densidad, el nivel al que queda la gutapercha y el sellado coronal (7) (Figura 3).

La obturación previene la filtración coronal y la contaminación bacteriana, sella el ápice con respecto a los fluidos tisulares periapicales y sepulta los irritantes que permanecen en el conducto. La mayoría de las técnicas emplean un núcleo central y un cemento sellador, sin embargo, se ha demostrado que ningún material ni ninguna técnica evitan totalmente la filtración (8,9).



*Figura 3. Obturación del sistema de conductos radiculares de un molar inferior*

***Imagen radiográfica representativa de la obturación radicular y el efecto de un tratamiento de conductos. A) Radiografía preoperatoria que muestra lesiones radiolúcidas en ápices de las raíces mesial y distal. B) Radiografía de control a los 5 años en que aparece el órgano dental y los tejidos circundantes sanos (2).***

### **2.4.3. Irrigación**

Los objetivos de la irrigación en endodoncia consisten en limpiar los residuos, lubricar el conducto, disolver el tejido orgánico e inorgánico y evitar la formación de barrillo dentinario durante la instrumentación o disolverla cuando se forme (10).

La eficacia mecánica dependerá de la capacidad de la irrigación para generar fuerzas óptimas de flujo en el conjunto del sistema de conductos radiculares. La eficiencia química variará según la concentración del irrigante antimicrobiano, el área de contacto y la duración de la interacción entre el irrigante y el material infectado. La eficacia final de la desinfección endodóntica dependerá de su eficiencia química (11).

La función biológica de los irrigantes está relacionada con sus efectos antimicrobianos. Los irrigantes deben tener una alta eficacia frente a microorganismos anaerobios y facultativos en su estado planctónico y en biopelículas, inactivar las endotoxinas, no ser tóxicos cuando entran en contacto con los tejidos vitales y no provocar una reacción anafiláctica (10).

Un irrigante óptimo tendría las características que se consideran beneficiosas en Endodoncia, pero ninguna de las propiedades negativas o perjudiciales (2).

Se han determinado las propiedades del irrigante ideal para el tratamiento de conductos radiculares, las cuales son: no irritar los tejidos periapicales, permanecer estable en solución, tener un efecto antimicrobiano prolongado, estar activo en presencia de sangre, suero y derivados proteicos de los tejidos, tener una tensión superficial baja, no interferir en la reparación de los tejidos periapicales, no manchar la estructura de los dientes, poder inactivarse en un medio de cultivo, no inducir una respuesta inmunitaria, ser capaz de eliminar completamente el barrillo dentinario, ser no antigénico, no tóxico y no carcinogénico, no tener efectos adversos en la dentina expuesta y en la capacidad de sellado, ser cómodo de aplicar y relativamente económico; sin embargo, en la actualidad no existe ninguna solución que pueda considerarse óptima (2).

### **2.5. IRRIGANTES EN ENDODONCIA**

#### **2.5.1. Hipoclorito de sodio**

El NaOCl es la solución irrigante más utilizada ya que es un excelente antibacteriano, tiene un pH de 11, capaz de disolver el tejido necrótico, tejido pulpar vital y los componentes orgánicos de dentina y biopelículas (12).

Se utiliza en concentraciones comprendidas entre el 0.5 y el 6% para la irrigación de los conductos radiculares, sin embargo, se ha demostrado que en concentraciones elevadas tiene mayor eficacia frente a *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* y mayor capacidad de disolución de los tejidos (13,14).

Si se extrude NaOCl de forma inadvertida a través del ápice, pueden producirse accidentes graves como dolor intenso, edema de los tejidos blandos adyacentes, posible extensión del edema a la mitad lesionada de la cara y el labio superior, hemorragia profusa en el conducto radicular, sangrado intersticial profuso con hemorragia en la piel y las mucosas (equimosis), gusto a cloro e irritación de la garganta después de la inyección en el seno maxilar, y es posible infección

secundaria y anestesia o parestesia reversible (15) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



*Figura 4. Lesiones ocasionadas por extrusión de NaOCl*

***Fotografía de una paciente, mostrando amplia hinchazón facial del lado izquierdo, formación de hematomas y equimosis circunorbitaria bilateral a causa de la extrusión inadvertida de NaOCl durante un tratamiento de conductos (15).***

### **2.5.2. Clorhexidina**

La clorhexidina (CHX) se ha usado como irrigante y medicamento en endodoncia durante más de una década; tiene un pH comprendido entre 5.5 y 7, es fácilmente soluble en agua y muy estable, es un agente antimicrobiano de amplio espectro, efectivo contra bacterias grampositivas y gramnegativas y contra levaduras (16,17). Según su concentración puede tener efectos bactericidas y bacteriostáticos. En concentraciones altas, la CHX actúa como detergente y, al dañar la membrana celular, causa una precipitación del citoplasma y por lo tanto tiene un efecto bactericida. En concentraciones bajas, la CHX es bacteriostática y provoca el vertido

de sustancias de peso molecular bajo (es decir, potasio y fosforo), sin dañar la célula de forma irreversible (18).

La molécula de CHX (Figura 5) puede ser absorbida por sustratos aniónicos, como la mucosa oral y la estructura dentaria, es decir, puede ser absorbida fácilmente en hidroxiapatita y dientes; se ha demostrado que esta reacción es reversible, provocando que se lleve a cabo una captación y liberación de CHX que da lugar a una actividad antimicrobiana sustantiva conocida como sustantividad (19,20).

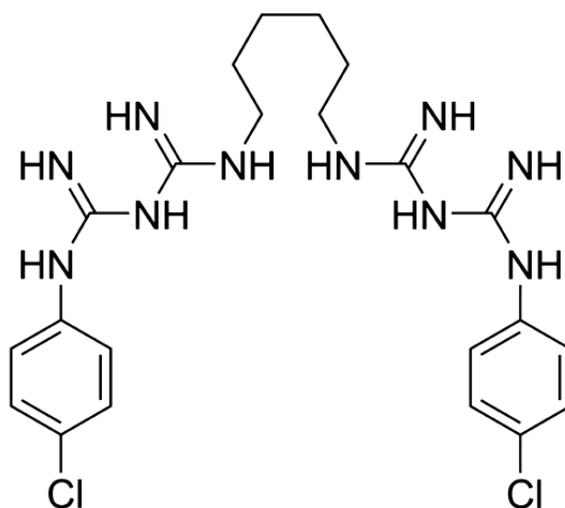


Figura 5. Estructura química de gluconato de Clorhexidina (CHX)

**Dibujo esquemático de la estructura molecular del gluconato de clorhexidina (CHX) (10).**

El efecto de sustantividad, así como el efecto antibacteriano que posee la CHX depende de la concentración utilizada, que normalmente en odontología estriba entre el 0.12 y el 2%, a estas concentraciones está demostrado que tiene poca toxicidad tisular, local y sistémica (21).

La CHX al 12% tiene una mejor eficacia antibacteriana que al 0.12% in vitro. El NaOCl presenta una ventaja evidente con respecto a la CHX que es la capacidad de disolución de la materia orgánica, de la cual su variante carece; por lo tanto, aun

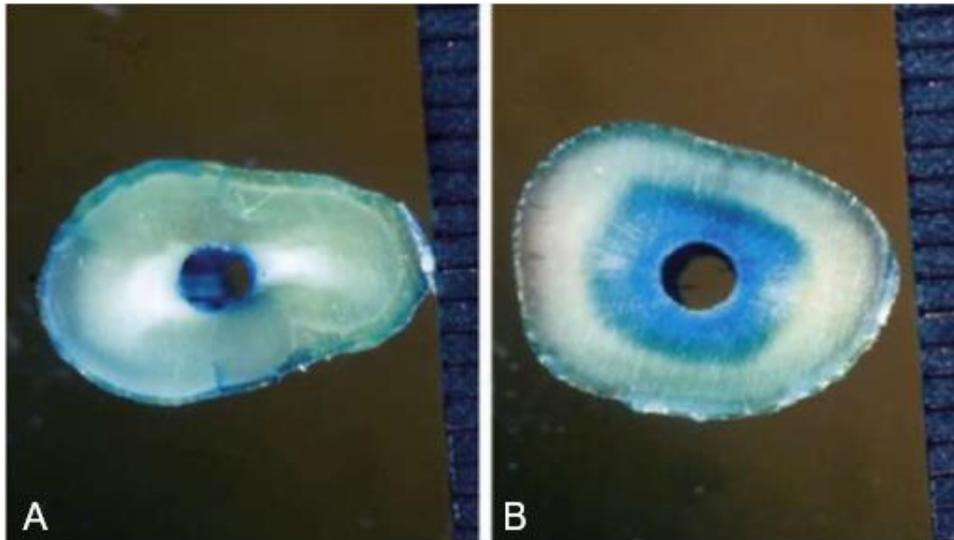
cuando los estudios in vitro indican algunas ventajas con el uso de la CHX, cuando se añade tejido orgánico o dentario, el NaOCl resulta claramente preferible (2). Sin embargo, cuando la CHX se combina con NaOCl se produce un cambio de color y un precipitado insoluble posiblemente tóxico (4-cloroanilina: PCA), el cual penetra en los túbulos dentinarios y puede interferir en el sellado de la obturación radicular. La PCA es toxica en humanos con exposición a corto plazo, produciendo una cianosis resultante, que es una manifestación de la formación de metahemoglobina (22).

### **2.5.3. Agentes de descalcificación o quelantes**

El barrillo dentinario fue definido por la American Association of Endodontists en 2003 como una película superficial de residuos retenida en la dentina u otra superficie después de la instrumentación con instrumentos rotatorios o limas endodónticas. Este consiste en partículas de dentina, restos de tejido pulpar vital o necrótico, componentes bacterianos e irrigantes retenidos (2).

Los agentes de quelación se introdujeron en endodoncia como adyuvante en la preparación de conductos radiculares estrechos y calcificados en 1957 por Nygaard-Østby (23).

Actualmente se ha determinado de gran importancia la remoción de esta capa de limalla o también conocida como “debris” ya que se ha visto como una barrera física al ocluir los túbulos dentinarios, limitando la acción de los irrigantes e impidiendo la creación de un sellado apical al evitar el íntimo contacto entre los selladores, gutapercha y las paredes dentinarias. Por lo cual se han promocionado distintas soluciones quelantes en el mercado que permitan eliminar estas virutas de dentina y restos de tejido orgánico para lograr una mejor desinfección y, por tanto, un mejor pronóstico y mayor porcentaje de éxito en el tratamiento endodóntico (Figura 6).



*Figura 6. Penetración de irrigantes en los túbulos dentinarios*

***Fotografía ilustrativa de la penetración de irrigantes en los túbulos dentinarios representada con tinte azul en cortes coronales. A) Irrigación con agua de grifo seguida de tinte azul. B) Eliminación del barrillo dentinario con EDTA al 17% seguido de irrigación con tinte azul (2). Obsérvese la diferencia.***

#### 2.5.3.2. Ácido etilendiaminotetracético

El ácido etilendiaminotetracético, también conocido como EDTA (Figura 7) es un agente de quelación que tiene la capacidad de secuestrar los iones metálicos catiónicos de dos a tres cargas positivas como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . En la exposición directa durante un periodo de tiempo prolongado, el EDTA extrae las proteínas superficiales bacterianas al combinarse con iones metálicos de la envoltura celular, lo que puede llevar en su caso a la destrucción de las bacterias (23).

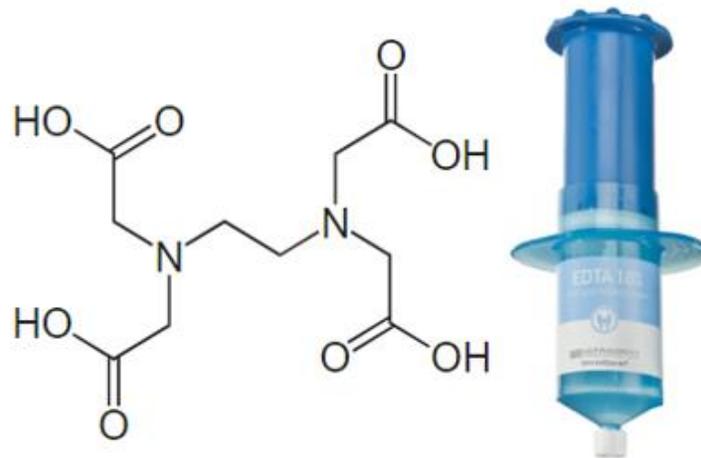


Figura 7. Estructura química y solución quelante, EDTA 18%

**Fotografía del producto EDTA al 18% de la casa comercial Ultradent (24).**

Agentes de quelación como el EDTA forman un complejo estable con el  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando todos los iones disponibles están enlazados, se alcanza el equilibrio y no se produce mayor disolución; por lo tanto, el EDTA es autolimitante (23).

En general, el EDTA en solitario no puede eliminar el barrillo dentinario de manera eficaz, debe añadirse un componente proteolítico, como el NaOCl, para eliminar los componentes orgánicos de este barrillo. Para la preparación de los conductos radiculares, el EDTA tiene un valor limitado como líquido de irrigación si se utiliza solo. Normalmente se utiliza en concentración del 17% y puede eliminar el barrillo dentinario cuando se encuentra en contacto directo con la pared del conducto durante menos de 1 minuto. Aun cuando el EDTA tiene una acción autolimitada, si se deja en el conducto durante tiempo o se utiliza NaOCl después del EDTA, se ha observado que produce erosión de la dentina (25) (Figura 8).

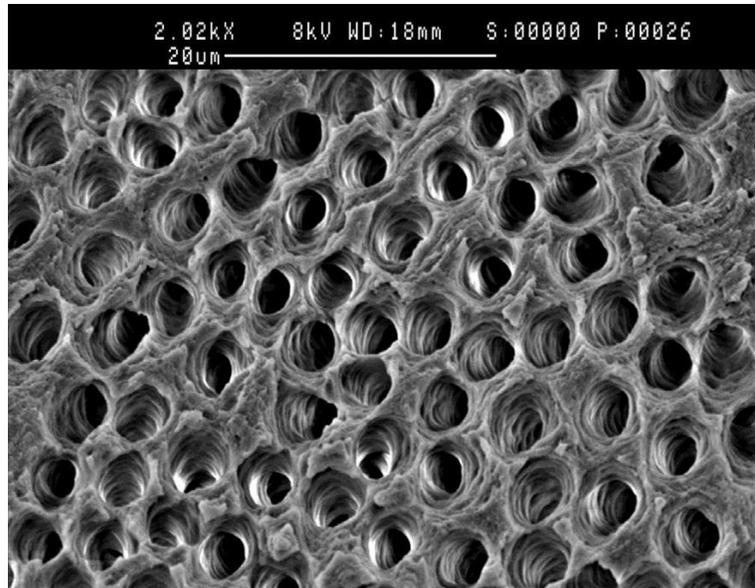


Figura 8. Erosión dentinaria producida por EDTA/NaOCl

**Imagen de un microscopio electrónico de barrido (MEB) que muestra la erosión dentinaria de la pared de un conducto radicular después del uso de EDTA seguido de la irrigación de NaOCl (10).**

### 2.5.3.3. Ácido etidróico

El ácido etidróico es un bifosfonato que afecta el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  y se considera un agente de quelación débil. Constituye una posible alternativa al EDTA, ya que carece de reactividad a corto plazo con el NaOCl. Puede utilizarse en combinación con el NaOCl sin influir en sus propiedades proteolíticas o antimicrobianas. No es tóxico y se emplea en medicina para tratar las enfermedades óseas.

### 2.5.3.4. Biopure MTAD y Tetraclean

Actualmente a los nuevos irrigantes se les ha añadido detergente (por ejemplo Tween 80) para reducir su tensión superficial ya que se ha comprobado que los irrigantes con baja tensión superficial tienen mejor humectabilidad y se supone que pueden penetrar con más facilidad en los túbulos dentinarios y en las irregularidades

anatómicas (2). MTAD Y Tetraclean son dos irrigantes basados en una mezcla de antibióticos, ácido cítrico y un detergente. Estos irrigantes son capaces de eliminar el barrillo dentinario y el tejido orgánico del sistema de conductos infectado (26).

El MTAD (Figura 9) fue introducido por Torabinejad y Jhonson en la Loma Linda University en 2003, este irrigante consiste en doxiciclina al 3%, un antibiótico de amplio espectro, ácido cítrico al 4.25%, un detergente desmineralizante, y un detergente, polisorbato-80 al 0.5% (Tween 80) (26).



*Figura 9. Recipiente con Biopure MTAD*

***Fotografía que muestra un irrigante relativamente nuevo, Biopure MTAD, producto comercial de la casa comercial Dentsply Tulsa Dental Specialities (2).***

Tetraclean es una combinación similar al MTAD. Con la diferencia de que este está compuesto por doxiciclina 50 mg/5 ml y el tipo de detergente es polipropilenglicol (10).

### 2.5.3.5. QMix

QMIX se introdujo en 2011. QMiX es uno de los nuevos productos combinados utilizados como irrigante antimicrobiano y como agente para eliminar el barrillo

dentinario y los residuos de las paredes de los conductos radiculares (Figura 10). Su empleo se recomienda al final de instrumentación, después de la irrigación con NaOCl. QMiX contiene EDTA, CHX y triclosano (detergente) y se propone como irrigación final. Si se utilizó NaOCl durante la limpieza y conformación, se debe usar solución salina para enjuagar el NaOCl y prevenir la formación de PCA (aunque no se ha descrito ningún precipitado al mezclar QMiX y NaOCl) (10).



*Figura 10. QMix*

***Fotografía representativa del producto comercial de QMix como coadyuvante en la irrigación del sistema de conductos radiculares en el tratamiento endodóntico (10).***

### **2.5.4. *Azadirachta indica***

#### **2.5.4.1. Generalidades**

*Azadirachta indica*, también conocida como Neem, es una planta común que se cultiva en varias partes de la India por motivos religiosos y medicinales (Figura 11).



Figura 11. Planta de Neem (*Azadirachta indica*)

**Fotografía del árbol de Neem en la que se puede apreciar las hojas, corteza y semillas (27).**

Sus compuestos se dividen en dos clases principales: isoprenoides y no isoprenoides.

Isoprenoides	No isoprenoides
diterpenoides	Proteínas (aminoácidos)
Triterpenoides que contienen protomeliacinas, limonoides, azadirona y sus derivados	Carbohidratos (polisacáridos)
Gedunin y sus derivados	Compuestos sulfurosos
Tipo de compuestos de vilasinina	Polifenoles como los flavonoides y sus glucósidos
Csecomeliacinas como nimbin, nimbinin, nimbolide, nimbidato de sodio, salanina y azadiractina	dihidrocalcona
	cumarina y taninos
	compuestos alifáticos

Tabla 1. Composición química del Neem

**Descripción de los compuestos principales del Neem (28).**

El árbol de Neem fue descrito como *Azadirachta indica* por el Dr. Jussieu en 1830, y su posición taxonómica es la siguiente:

Taxonomía	
Orden:	Rutales
Suborden:	Rutinae
Familia:	Meliaceae (familia de la caoba)
Tribu:	Melioideae
Género:	Azadirachta
Especie:	indica

Tabla 2. Taxonomía biológica del Neem

### **Clasificación taxonómica correspondiente a la planta de Neem (28).**

Cada parte del árbol, incluidas las hojas, la corteza y las semillas, tienen propiedades medicinales, como: antiinflamatoria, antipalúdica, antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antipirética, antioxidante, analgésica, inmunoestimulante, antifertilidad, antiacné, antihiper glucemiante, anticancerígena y nematocida (28).

La US National Academy of Sciences reconoció la importancia del árbol de Neem en 1992 y lo tituló como “un árbol para resolver problemas globales” (28).

Se ha encontrado que es activo contra muchos trastornos terribles como la hepatitis, las infecciones virales, la malaria y el cáncer (28).

Compuesto de Neem	Fuente	Actividad biológica
nimbidina	Hoja	Antiinflamatorio
		Antiartrítico
		Antipirético
		Hipoglucemiante
		Úlcera gástrica
		Espermicida
		Antifúngico
		Antibacteriano
		Diurético
nimbidato de sodio	Hoja	Antiinflamatorio
Nimbín	Aceite de semilla	Espermicida
nimbolida	Aceite de semilla	Antibacteriano
		Antipalúdico
Gedunin	Aceite de semilla	Antifúngico
		Antipalúdico
azadiractina	Semilla	Antipalúdico
Ácido gálico, epicatequina y catequina	Ladrar	Antiinflamatorio e inmunomodulador
Margolona, margolonona e isomargolonona	Ladrar	Antibacteriano
Trisulfuro cíclico y tetrasulfuro cíclico	Hoja	Antifúngico
polisacáridos		Antiinflamatorio
Polisacáridos GIa, GIb	Ladrar	Antitumoral
Polisacáridos GIIa, GIIIa	Ladrar	Antiinflamatorio
Peptidoglicano NB-II	Ladrar	Inmunomodulador

Tabla 3. Actividad biológica de los compuestos químicos del Neem

**En la tabla se muestran cada uno de los componentes del árbol de Neem, así como la fuente de la que provienen y sus propiedades (28).**

#### 2.5.4.2. Azadirachta indica en odontología

El extracto de Neem es un agente antibacteriano natural, el cual tiene efecto contra microorganismos causantes de la caries dental como: *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. mitis* y *S. sanguis*, utilizado como palitos secos masticables (29), así como también se ha demostrado su efecto antibacteriano contra *E. faecalis* (30).

El extracto etanólico y acuoso de la hoja de Neem tiene un efecto significativo en la adhesión, la hidrofobicidad de la superficie celular y la formación de biopelículas, que pueden afectar la colonización por *C. albicans* (31).

El aceite de Neem muestra una actividad antibacteriana significativa y se ha sugerido para su uso en el tratamiento de la placa dental. Así como se ha encontrado que el gel dental mucoadhesivo que contiene *Azadirachta indica* es beneficioso para reducir el índice de placa y el recuento de bacterias salivales es comparativamente mejor que el enjuague bucal con gluconato de clorhexidina (32).

El extracto de hoja de enjuague bucal de Neem es tan efectivo como la CHX para reducir los índices periodontales y puede usarse como una terapia alternativa en el tratamiento de la enfermedad periodontal (33), mostrando así su biocompatibilidad con el fibroblasto periodontal humano (34).

Se ha descubierto también que la barra de Neem es eficaz como cepillo de dientes para reducir la placa dental y la inflamación gingival (35).

### 2.5.4.3. *Azadirachta indica* como medicación intraconducto

Los medicamentos intraconducto desempeñan un papel complementario en la terapia endodóntica, ya que ayudan a eliminar los microorganismos restantes en el sistema de conductos radiculares que no han sido eliminados por la preparación quimiomecánica, incluidos los procesos de instrumentación e irrigación (36).

Estos medicamentos entran en estrecho contacto con el tejido perirradicular, por lo que sus productos de degradación deben ser biocompatibles con el tejido periapical. De lo contrario, estos medicamentos darán lugar a una reacción inflamatoria intensa, mediada por varios mediadores inflamatorios que a su vez pueden inducir la destrucción del tejido e interferir con la curación perirradicular (36).

Estudios han evaluado la medicación intraconducto a base de hierbas como el Neem, resultando este con un excelente efecto antibacteriano (37).

Por otro lado, al utilizar aceite de Neem como medicación intraconducto se ha determinado que su citotoxicidad es directamente proporcional con las concentraciones; a medida que disminuye la concentración el porcentaje de células viables aumenta (36).

### 2.5.4.4. *Azadirachta indica* como irrigante del conducto radicular

Las propiedades antioxidantes y antimicrobianas convierten al Neem en un agente potencial para la irrigación de conductos radiculares como alternativa del NaOCl. La literatura sugiere que el extracto de hoja de *Neem* tiene un efecto antimicrobiano eficaz contra *E. faecalis* y *C. albicans* en comparación con el NaOCl al 2% (38–41) y la CHX al 0.2% (42–45).

Se han documentado diferentes técnicas para estudiar los atributos que posee esta planta, una de las más relevantes para elaborar el irrigante de Neem es a partir del extracto de la hoja (28).

El proceso consiste en la recolección y lavado de 25 gr de hojas maduras de Neem con agua destilada esterilizada, se agregan a 50 ml de etanol absoluto y la mezcla se macera por 1 o 2 minutos. El extracto se filtra a través de papel filtro. Se repite el proceso de extracción utilizando el residuo grueso con 25 ml de etanol y se filtra nuevamente. Ambos extractos deben mezclarse y filtrarse con papel de filtro rápido. La porción de alcohol debe eliminarse del extracto en un baño de agua hasta que el volumen sea de 25 ml. La temperatura no debe superar los 45-50 °C. Después de aproximadamente 6 horas el líquido está listo para utilizarse como irrigante y debe almacenarse en un recipiente hermético (28) (Figura 12).



Figura 12. Técnica de elaboración del extracto de la hoja de Neem

**Fotografías demostrativas del proceso de elaboración del extracto etanólico de Neem. A) Hojas de Neem, B) Maceración de hojas de Neem, C) Proceso de filtración, D) Etanol puro, E) Baño de agua (28).**

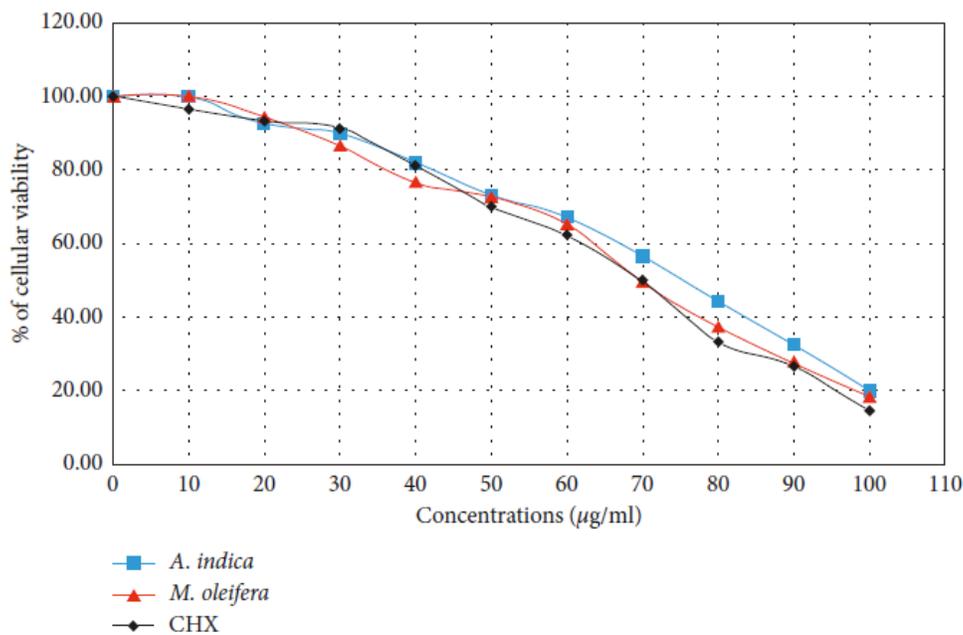
### 2.5.4.4. Citotoxicidad de *Azadirachta indica*

La citotoxicidad es un concepto que se puede aplicar en cualquiera de las siguientes situaciones: muerte celular o alteración de su metabolismo. Los efectos citotóxicos se relacionan con daño a procesos vitales que desencadenan la activación de vías que llevan a la muerte celular. Durante este proceso participan proteasas, cinasas y fosfatasa que regulan los diferentes pasos de estas vías, acabando dependiendo de la toxicidad con el número total de eritrocitos, plaquetas, linfocitos, monocitos y granulocitos (46).

El uso de Neem como irrigante endodóntico puede ser ventajoso porque es un excelente antioxidante con una biocompatibilidad muy alta y, por lo tanto, no existe riesgo de toxicidad tisular con su uso. La biocompatibilidad del *Neem* con los

fibroblastos del ligamento periodontal humano ya ha sido probada, y este es un factor importante que favorece su aplicación clínica en endodoncia (28).

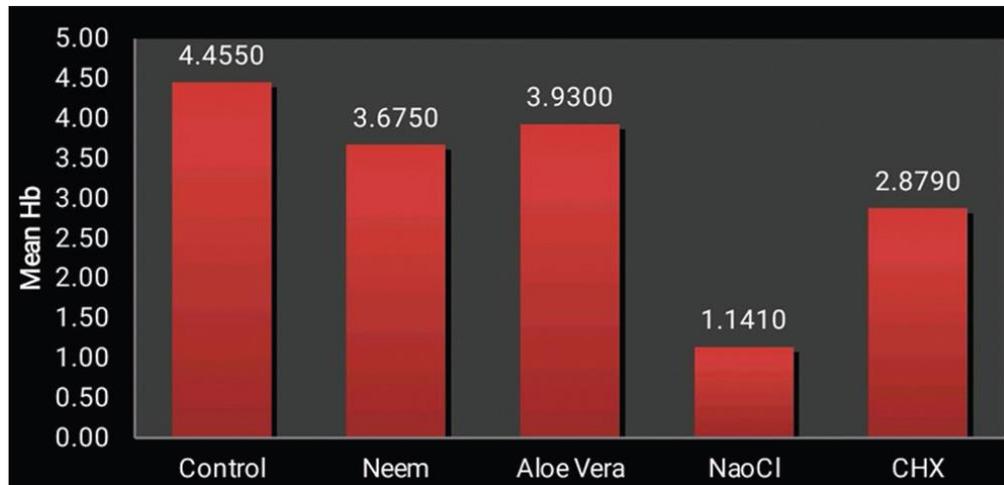
Son escasos los estudios que han evaluado la citotoxicidad del extracto metanólico de esta planta hindú (Gráfica 1) como irrigante endodóntico. Sin embargo, los existentes han demostrado un excelente efecto antibacteriano sin ningún porcentaje de citotoxicidad cuando se utiliza a bajas concentraciones (47).



Gráfica 1. Viabilidad celular de células Jurkat frente extractos herbales contra *Enterococcus faecalis*.

**La gráfica muestra el efecto antibacteriano de *Moringa oleifera* y *Azadirachta indica* contra *E. faecalis* sin ningún porcentaje de toxicidad utilizado a una baja concentración (47).**

Así mismo, al comparar el extracto acuoso de Neem con otros irrigantes como el NaOCl y la CHX (Gráfica 2) se ha demostrado que este produce una citotoxicidad significativamente menor (48).



Gráfica 2. Hemoglobina corpuscular media en glóbulos rojos

**Representación gráfica en la que se demuestra que el extracto acuoso del Neem produjo menor citotoxicidad en comparación con los irrigantes químicos (NaOCl y CHX) y mayor en comparación con el extracto acuoso de Aloe Vera (48).**

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la literatura ha evaluado el efecto antibacteriano de *Azadirachta indica*, sin embargo, a pesar de sus numerosas propiedades son pocos los estudios reportados en donde se valore la citotoxicidad y su aplicación como irrigante endodóntico.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿El extracto de *Neem* se puede utilizar como irrigante en tratamientos de conductos?

Para responder a la pregunta anterior se propuso un método sencillo y accesible al laboratorio de la Facultad de Odontología, midiendo la densidad óptica de la hemólisis que provoca el extracto etanólico de *Neem* sobre la membrana de eritrocitos al 4%.

## IV. JUSTIFICACIÓN

El irrigante de elección en el tratamiento de conductos desde hace muchos años por su gran actividad antimicrobiana ha sido el hipoclorito de sodio (NaOCl), sin embargo, su efecto tóxico al estar en contacto con el tejido periapical ha llevado a la búsqueda de otras alternativas, tal es el caso del estudio de plantas medicinales como la *Azadirachta indica* que también posee actividad antimicrobiana. Con este razonamiento se decide evaluar la citotoxicidad del extracto etanólico de Neem, como irrigante endodóntico, midiendo la actividad hemolítica en eritrocitos humanos y comparando dicha actividad con la solución de NaOCl al 5.25%.

La introducción de un nuevo irrigante con efecto antibacteriano comparable con el NaOCl sin sus efectos adversos como la alta toxicidad traería consigo diversas ventajas tanto para el profesional como para el paciente en la realización de tratamientos endodónticos

## **V. HIPÓTESIS**

### **5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El presente estudio permitirá identificar si hay diferencias en la citotoxicidad entre el extracto etanólico de Neem comparado con el hipoclorito de sodio al 5.25% sobre la hemólisis de glóbulos rojos.

### **5.2. HIPÓTESIS NULA**

No existirá diferencia estadísticamente significativa al comparar la citotoxicidad entre el extracto etanólico de Neem comparado con el NaOCl al 5.25% sobre la hemólisis de glóbulos rojos, con un nivel de confianza del 95%.

### **5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Existirá diferencia estadísticamente significativa al comparar la citotóxicidad entre el extracto etanólico de Neem comparado con el NaOCl al 5.25% sobre la hemólisis de glóbulos rojos, con un nivel de confianza del 95%.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar la actividad citotóxica del extracto etanólico de hojas de *Neem* contra el NaOCl al 5.25% para su uso como irrigante en endodoncia.

### 6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad hemolítica de extracto etanólico de hojas de *Neem* en eritrocitos humanos.
2. Evaluar la actividad hemolítica del NaOCl al 5.25% en eritrocitos humanos.
3. Analizar y comparar la actividad hemolítica en eritrocitos humanos del extracto etanólico de hojas de *Neem* y el NaOCl al 5.25%.

## VII. VARIABLES

### 7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Soluciones (Extracto etanólico de *Neem* e NaOCl al 5.25%)

### 7.2. VARIABLES DEPENDIENTES

Actividad hemolítica

### 7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES

Utilizando una microplaca de 96 pocillos, se colocaron 100  $\mu$ L del extracto etanólico de *Neem*, se realizó una dilución en serie, en la fila correspondiente y por triplicado en 100  $\mu$ L de solución salina. Finalmente, a cada pocillo se adicionaron 100  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos al 4%. De la misma manera se realizó con el NaOCl al 5.25%. Al término de la experimentación y a las 24 hrs se midió la absorbancia a 430 a 600 nm, en un lector multipozo, las muestras se observaron en un microscopio óptico y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando Análisis de Varianza ANOVA bidireccional.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. TIPO DE ESTUDIO

Experimental

### 8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO

Efecto hemolítico del extracto etanólico de Neem y del NaOCl al 5:25% a las diluciones de 1:1 hasta 1:256 sobre eritrocitos al 4%.

### 8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL

Para la experimentación, se utilizaron hojas de Neem secas y una solución de comercial de NaOCl al 5.25% (Clorox, Tijuana, México). Para la maceración del material vegetal, se utilizó etanol al 96%, un frasco de vidrio de boca ancha, papel filtro y una cabina de flujo (Eppendorf, Alemania).

En la medición de la actividad hemolítica se utilizaron tubos con tapón azul (citrato sódico) para la recolección de las muestras sanguíneas, una centrifuga (Thermolsher Scientific CL2), solución salina al 0.9% (Solución CS Pisa, cloruro de sodio) para el lavado de eritrocitos; se empleó también una placa de 96 pocillos (Corning™), una micropipeta (Eppendorf de 100-200 µL) y el lector de microplacas (Mindray MR-96A). Para la preparación de muestras y su observación con microscopio óptico se utilizaron portaobjetos, cubreobjetos, tinción de Wright y un microscopio (Primo Star Zeiss).

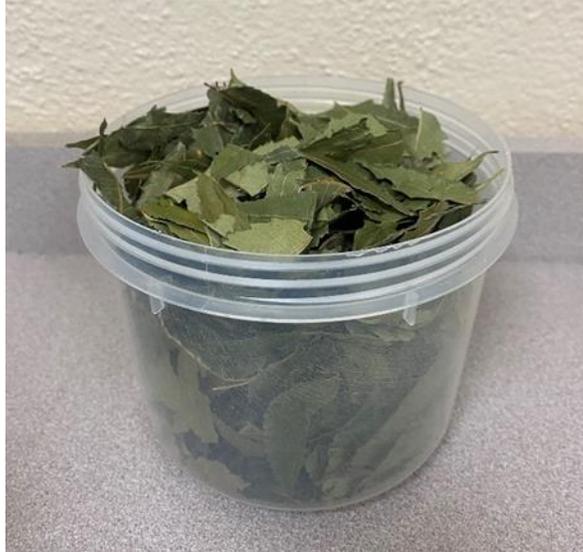
### 8.4. METODOLOGÍA

#### 8.4.1. MACERACIÓN DEL NEEM

Se tomaron 130 g de hojas secas de Neem (Figura 13, Figura 14) que posteriormente se trituraron en un molino (Proctor silox modelo 80300) para mayor superficie de contacto con el disolvente. Después se colocaron las hojas

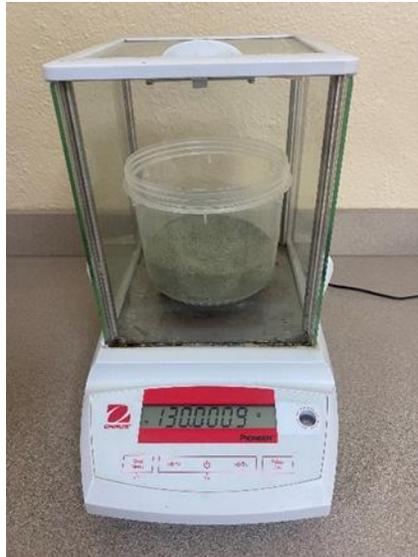
## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

pulverizadas del Neem en un frasco de vidrio con 50 ml de etanol al 96% (Figura 15; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y se dejó macerar por 1 semana. Después de una semana (Figura 16; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), se filtró por gravedad y el líquido se evaporó a temperatura ambiente hasta obtener el extracto crudo. El tiempo de proceso total fue aproximadamente de 2 semanas.



*Figura 13. Hoja de Neem*

***Fotografía que muestra un recipiente con las hojas del Neem recolectadas.***



*Figura 14. Pesaje de las hojas de Neem*

***En la figura se muestra el peso exacto de las hojas de Neem ya pulverizadas.***



*Figura 15. Solute y solvente*

***En la figura se muestra 130g de Neem pulverizado y 50 ml de etanol al 96%.***



Figura 16. Maceración del Neem

**En la figura se muestra la mezcla del polvo obtenido del Neem con el etanol al 96%.**

Se rotuló correctamente y se cerró herméticamente para evitar la evaporación del etanol. Se dejó reposar una semana a temperatura ambiente y en la obscuridad (Figura 17; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



Figura 17. Rotulación de la preparación

**Frasco cubierto de aluminio para impedir la afectación de los rayos UV a la mezcla.**

#### 8.4.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Se realizó el método propuesto por *Yang y cols. (2005)* y *Suwalsky y cols. (2015)* modificado (46).

1. Se obtuvieron 5 ml de sangre por punción venosa en un tubo azul con citrato de sodio (Figura 18).



*Figura 18. Muestra sanguínea*

***Muestra sanguínea obtenida depositada en un tubo con citrato de sodio.***

2. Los glóbulos rojos se separaron por centrifugación a 3 000 rpm durante 5 minutos (Figura 20, Figura 20). El paquete celular fue lavado tres veces con solución salina al 0.9% (Figura 21).



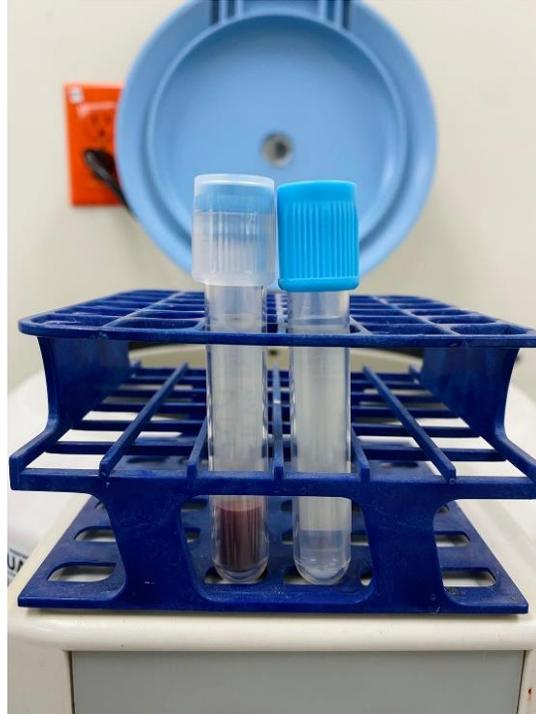
*Figura 19. Centrifuga*

***Fotografía de la centrifuga utilizada, Thermolsher Scientific CL2.***



*Figura 20. Glóbulos rojos centrifugados*

**La figura muestra la separación de los glóbulos rojos del plasma y glóbulos blancos por centrifugación.**



*Figura 21. Glóbulos rojos lavados*

**La figura representa el último lavado que se realizó a los eritrocitos con solución salina a 0.9%.**

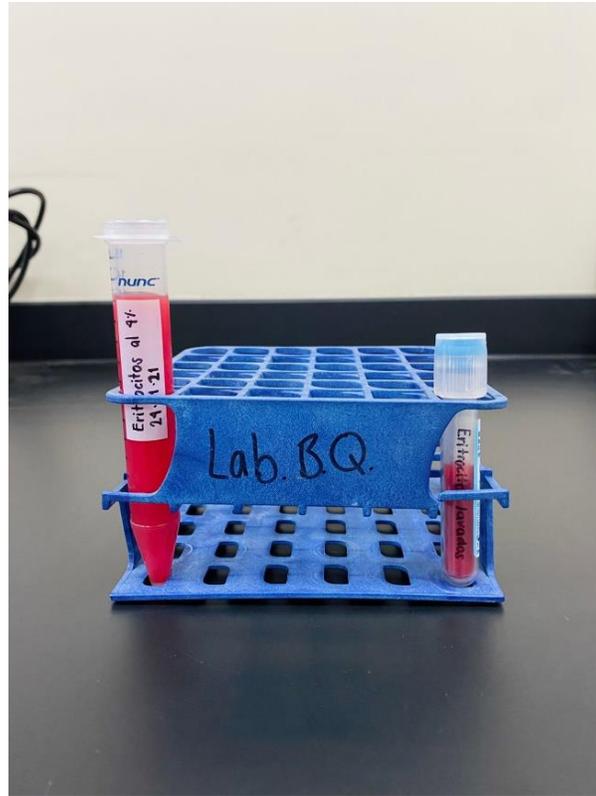
3. Se preparó una suspensión de glóbulos rojos al 4 % ( $4,5 \times 10^5$  -  $4,8 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ ) con solución salina al 0.9% (Figura 22Figura 23, Figura 23).

4. Agua destilada y solución salina fueron utilizados como control positivo y negativo respectivamente (Figura 24).



*Figura 22. Eritrocitos al 4%*

***Se tomaron 5 ml de eritrocitos a los que se agregaron 12.5 ml de solución salina al 0.9% para producir una concentración del 4% de los eritrocitos lavados.***



*Figura 23. Muestras de Eritrocitos*

***En la imagen se puede observar la muestra de eritrocitos lavados y la suspensión de eritrocitos al 4%.***



Figura 24. Soluciones de prueba

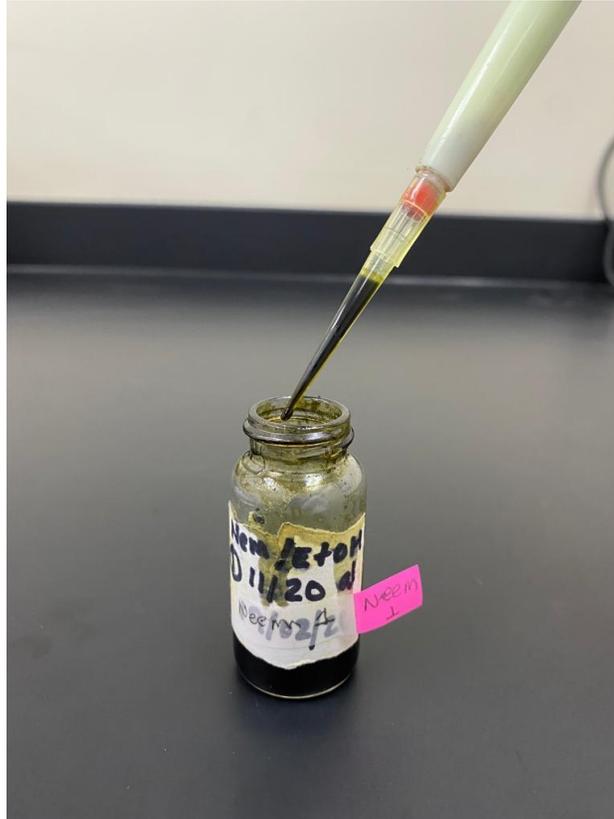
**Agua destilada, solución salina e NaOCl al 5.25% fueron utilizados como puntos de comparación en la experimentación.**

5. Preparación de la placa de 96 pocillos:

- a) Se colocaron 100  $\mu$ L de solución salina al 0.9% en las columnas 1 y 2 hasta la fila F y de la 4 a la 12 hasta la fila C.
- b) Se colocó 100  $\mu$ L de agua destilada en la columna 3 hasta la fila F.
- c) Se agregaron 100  $\mu$ L del extracto etanólico de *Neem* (Figura 25) en las celdas A4, B4 y C4. Posteriormente se llevó a cabo la dilución en serie hasta la columna 12.
- d) De igual manera se agregó NaOCl al 5.25% en las celdas D4, E4 y F4, realizando la dilución en serie hasta la columna 12.
- e) Finalmente se depositaron 50  $\mu$ L de eritrocitos al 4% en cada uno de los pocillos (Figura 26).

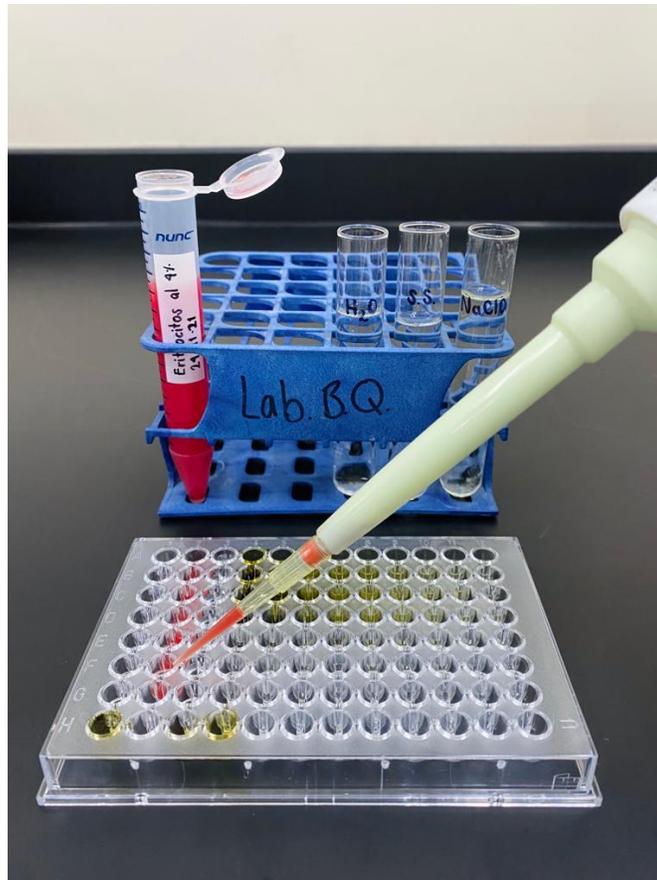
## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

- f) Todo el experimento se llevó a cabo por triplicado para tener mayor certeza de los resultados (Figura 27).
- g) La fila G se utilizó para medir la absorbancia del extracto etanólico del Neem y sus diluciones sin glóbulos rojos.



*Figura 25. Extracto etanólico de Neem*

***Fotografía de la muestra del extracto etanólico de Neem elaborado en el laboratorio de bioquímica.***



*Figura 26. Proceso de pipeteo*

***La fotografía muestra el proceso de colocación de las soluciones a diferentes diluciones en la placa de 96 pocillos.***

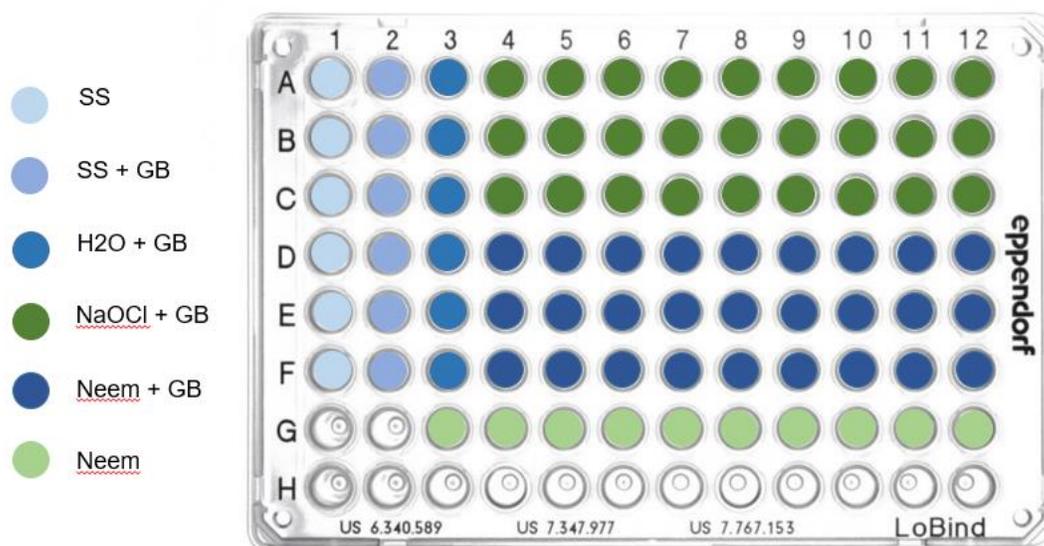


Figura 27. Distribución de las soluciones

**Representación esquemática de la distribución de las soluciones de prueba en la placa de 96 pocillos.**

La solución salina se determinó como blanco (SS), la dilución de glóbulos rojos en solución salina como grupo negativo (SS + GB) y la dilución de glóbulos rojos en agua destilada como grupo positivo (H<sub>2</sub>O + GB). La dilución de glóbulos rojos en el extracto etanólico de Neem (Neem + GB) y en NaOCl (NaOCl + GB) como soluciones a comparar y por último el extracto de Neem aislado (Neem) (Figura 28).



Figura 28. Placa de 96 pocillos lista para leerse en el lector multipozo.

**Fotografía de la placa de 96 pocillos una vez finalizado el proceso de evaluación en el cual se colocaron las diferentes soluciones de prueba.**

6. Se midió la absorbancia a 430-600 nm, en el lector multipozo (Figura 29).



Figura 29. Lector de microplaca

***Se utilizó un lector de microplaca Mindray MR-96A para analizar la actividad hemolítica de las soluciones de prueba.***

7. Se colocaron muestras de las diluciones en portaobjetos, se agregó tinción de Wright, se realizó el barrido de la muestras y se cubrieron con cubreobjetos para la observación con microscopio óptico con objetivo 100x (inmersión) y aumento total x1000 (Figura 30).



*Figura 30. Microscopio óptico*

***Fotografía del microscopio óptico utilizado, modelo Primo Star de la marca Zeiss.***

## **8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando el método de Análisis de Varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) bidireccional con el

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

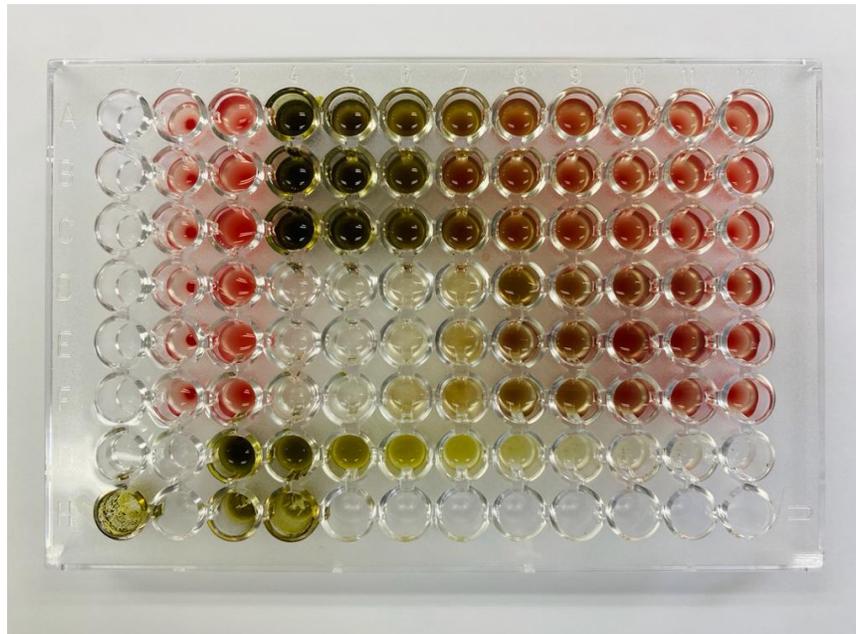
programa estadístico IBM SPSS. La diferencia fue considerada como significativa a  $p < 0.05$ .

## IX. RESULTADOS

### 9.1. Análisis visual

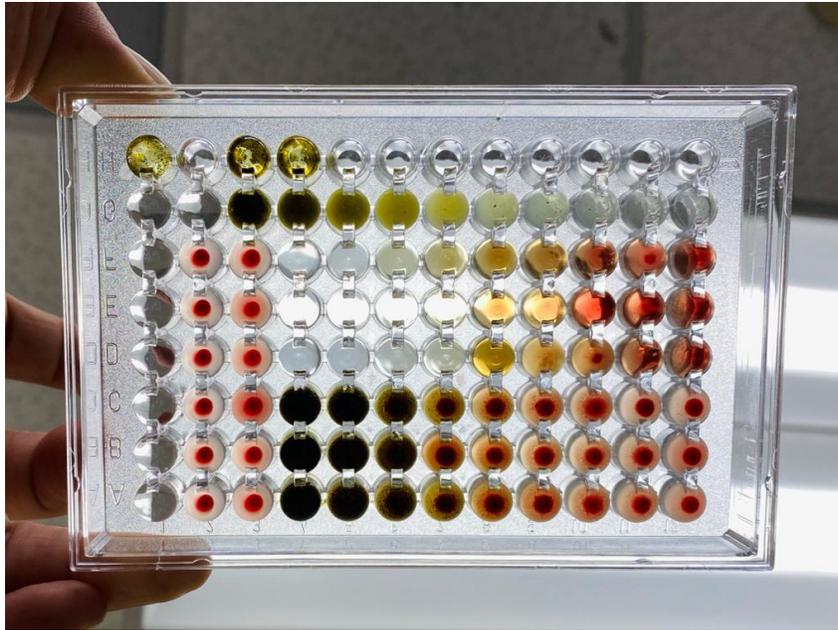
La placa de microtitulación o microplaca es una placa con múltiples pocillos que se utiliza como pequeños tubos de ensayo.

En los resultados del análisis visual de la placa de 96 pocillos se puede determinar que el Neem es tóxico hasta la concentración de 1:4 (celda A6), permitiendo la acumulación de los eritrocitos (formación de un botón rojo) en el fondo de los pocillos de las subsiguientes concentraciones.



*Figura 31. Placa de 96 pocillos*

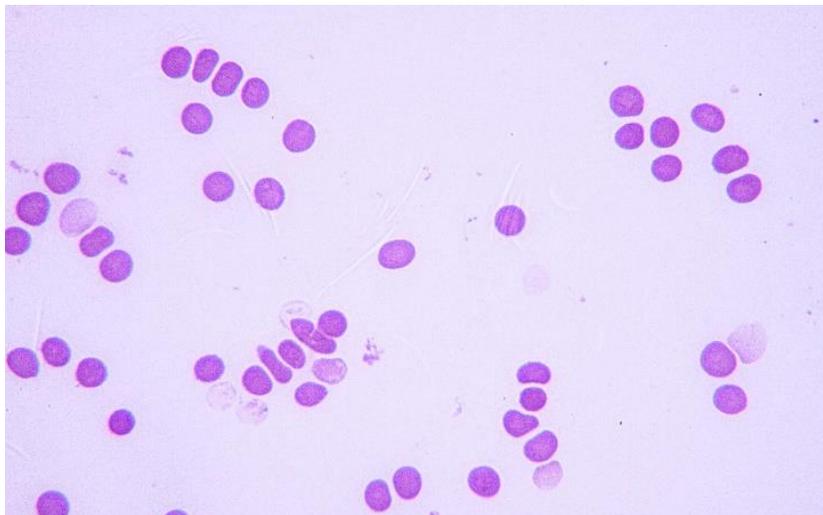
***Fotografía que exhibe el resultado visual final de las diluciones realizadas para evaluar la citotoxicidad del extracto etanólico de Neem comparado con el NaOCl.***



*Figura 32. Placa de 96 pocillos vista contra la luz.*

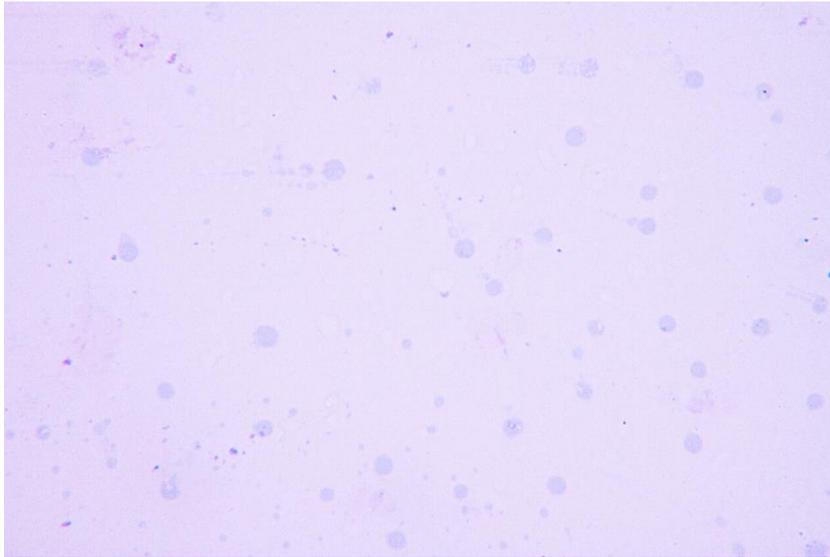
**Fotografía que muestra la formación de “botones rojos” en el fondo de algunos pocillos, indicativo de aquellas diluciones que no producen la hemolisis de los glóbulos rojos.**

## 9.2. Análisis microscópico



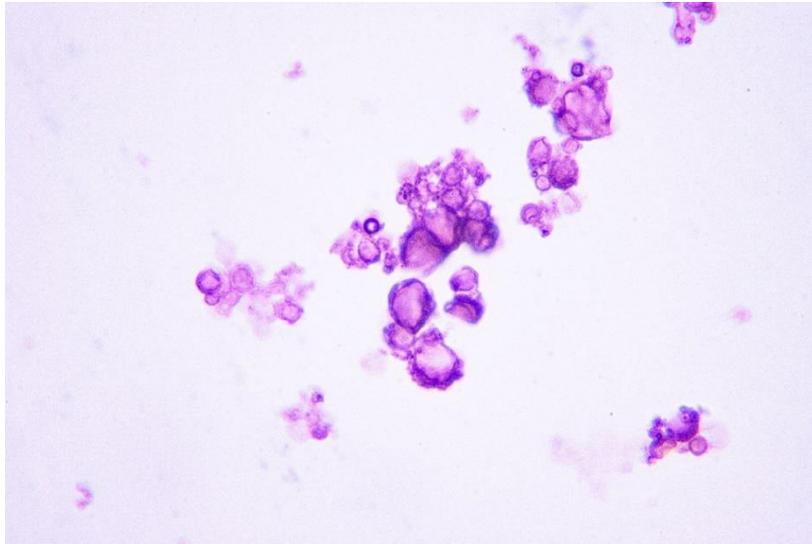
*Figura 33. Solución salina / Glóbulos rojos*

***Imagen microscópica correspondiente al pocillo A2 de la placa de 96 pocillos, en la que se muestra el comportamiento de los glóbulos rojos al diluirse en solución salina; las células sanguíneas se observan en tamaño, color y forma normales.***



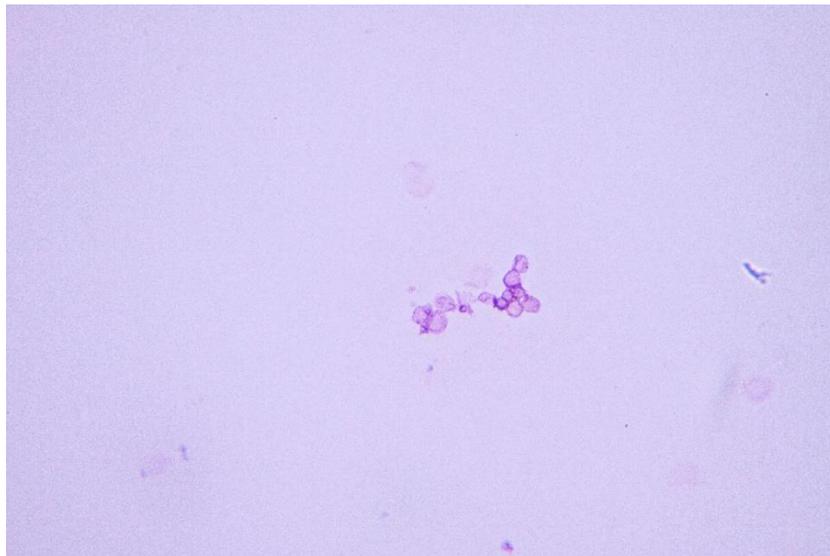
*Figura 34. Agua destilada / Glóbulos rojos*

***Imagen microscópica correspondiente al pocillo A3 que representa la dilución de los glóbulos rojos en agua destilada; se puede apreciar afectación de la integridad de los eritrocitos ya que se observa dilución de la concentración de la hemoglobina presente en las células sanguíneas, volviéndolas redondas y pálidas, sin embargo, no son destruidas.***



*Figura 35. Extracto etanólico de Neem 1:1 / Glóbulos rojos*

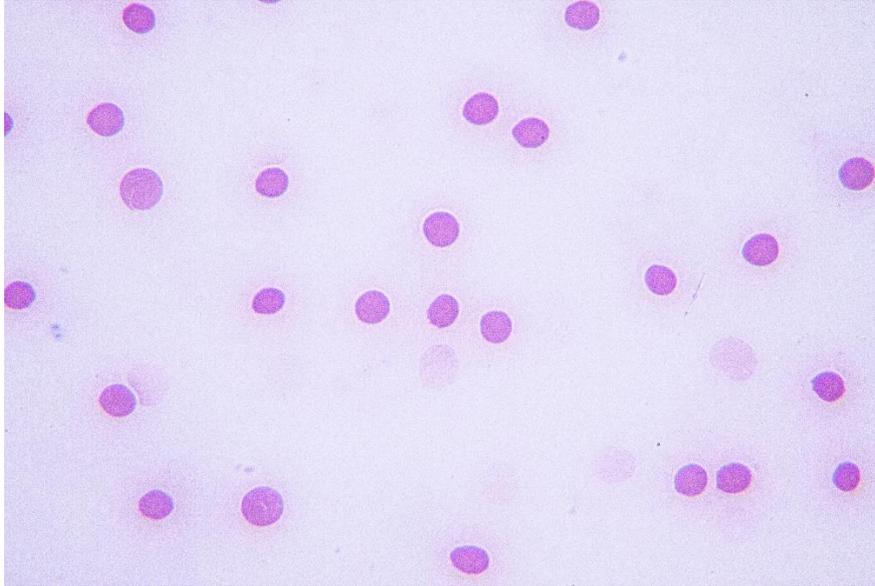
***Imagen microscópica respectiva al pocillo A4 que muestra la dilución de glóbulos rojos en el extracto etanólico de Neem a una concentración de 1:1 (100  $\mu$ L). Se puede evaluar como algún componente del Neem produce la aglomeración de los eritrocitos parcialmente degradados y sus membranas como corpúsculos teñidos.***



*Figura 36. Extracto etanólico de Neem 1:8 / Glóbulos rojos*

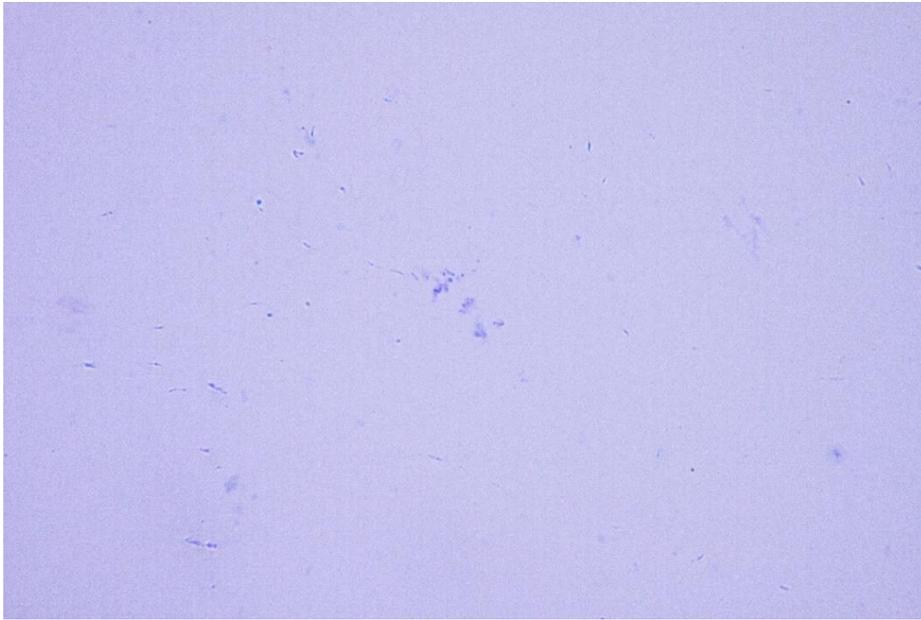
***Imagen microscópica del pocillo A7 correspondiente a la dilución 1:8 del extracto etanólico de Neem en solución salina sobre glóbulos rojos. En la imagen se muestra***

***una menor aglomeración y destrucción de células comparado con las concentraciones anteriores.***



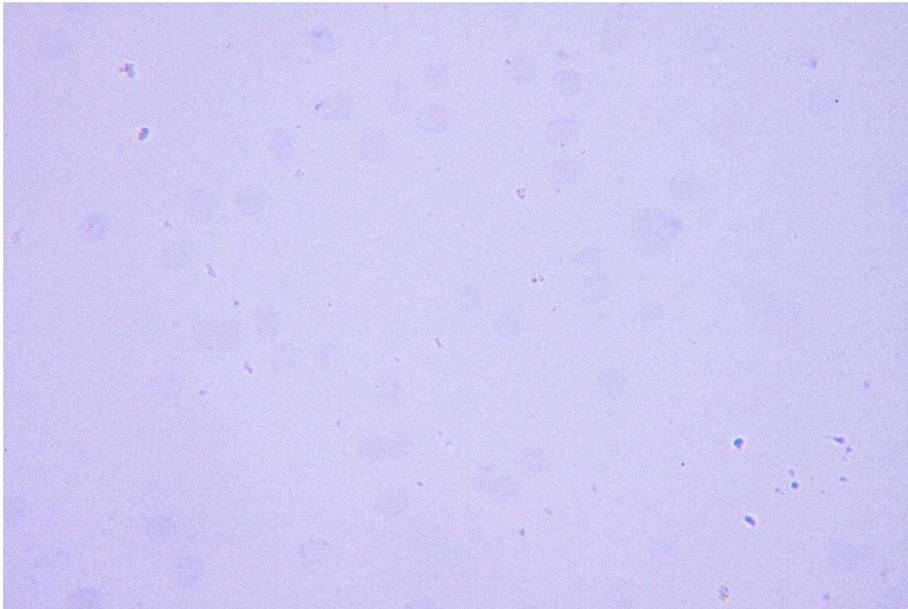
*Figura 37. Extracto etanólico de Neem 1:256 / Glóbulos rojos*

***La imagen microscópica respectiva a la celda A12 muestra la dilución 1:256 del extracto etanólico de Neem en solución salina sobre glóbulos rojos. En la imagen se puede apreciar la estructura completa de las células sanguíneas y por lo tanto un menor porcentaje de lisis.***



*Figura 38. NaOCl al 5.25% 1:1/ Glóbulos rojos*

***Representación microscópica de la celda D4 en la que glóbulos rojos fueron expuestos a NaOCl al 5.25% a una concentración de 1:1 en solución salina, produciéndose la destrucción completa de las células sanguíneas al primer contacto.***



*Figura 39. NaOCl al 5.25% 1:8 / Glóbulos rojos*

***Imagen microscópica de la exposición de 100  $\mu$ L de glóbulos rojos a NaOCl a una dilución de 1:8, en solución salina, en la cual se puede observar la ruptura de las membranas de las células sanguíneas quedando como artefactos o “sacos vacíos”.***



*Figura 40. NaOCl al 5.25% 1:256 / Glóbulos rojos*

***Imagen microscópica correspondiente a la exposición de glóbulos rojos con la menor concentración de NaOCl que se manejó en la experimentación (1:256), la cual produjo la contracción de las células sanguíneas, corroborando un proceso de hemolisis al no existir la presencia de hemoglobina.***



*Figura 41. Extracto etanólico de Neem 1:1*

***Imagen microscópica de la dilución 1:1 del extracto etanólico de Neem en solución salina, en la que se puede observar una composición de artefactos que no son pigmentados con los colorantes de muestra.***

### **9.2.1. Comparación de las observaciones microscópicas del extracto etanólico de Neem y el NaOCl al 5.25%**

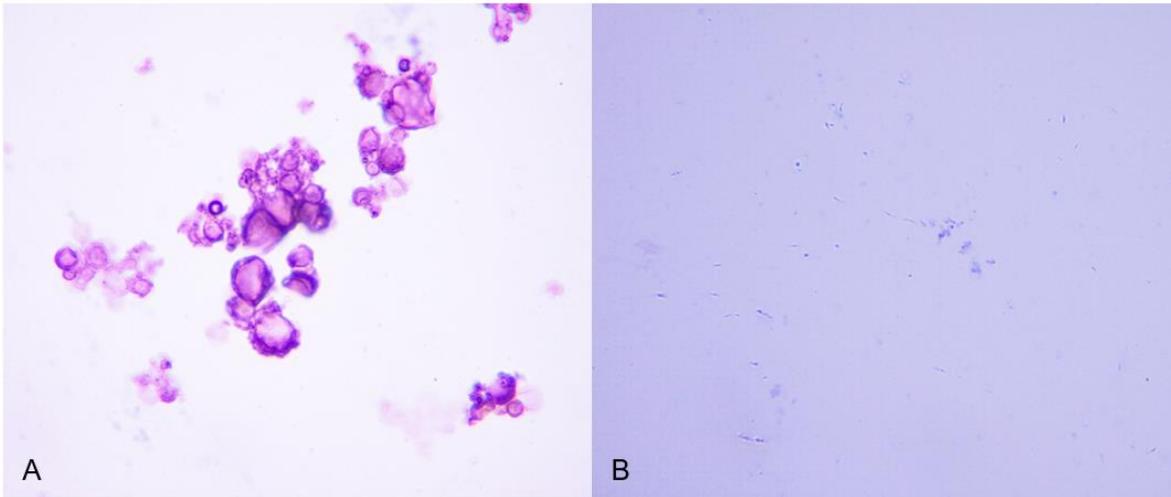


Figura 42. Dilución de 1:1.

**Comparación de la observación microscópica del frotis de glóbulos rojos expuestos a una dilución de 1:1. A) Extracto etanólico de Neem. B) NaOCl al 5.25%**

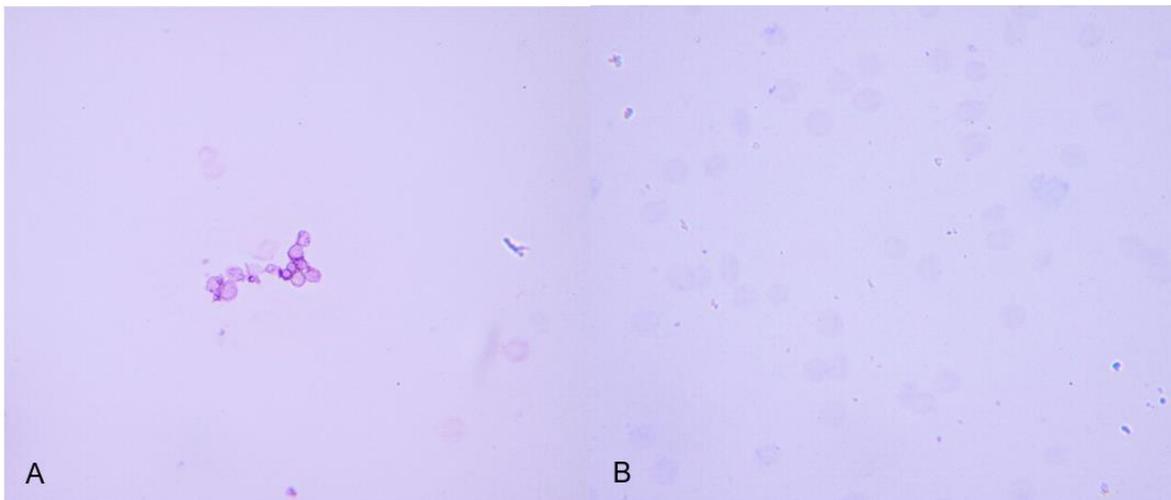


Figura 43. Dilución de 1:8

**Comparación de la observación microscópica del frotis de glóbulos rojos expuestos a una dilución de 1:8. A) Extracto etanólico de Neem. B) NaOCl al 5.25%.**

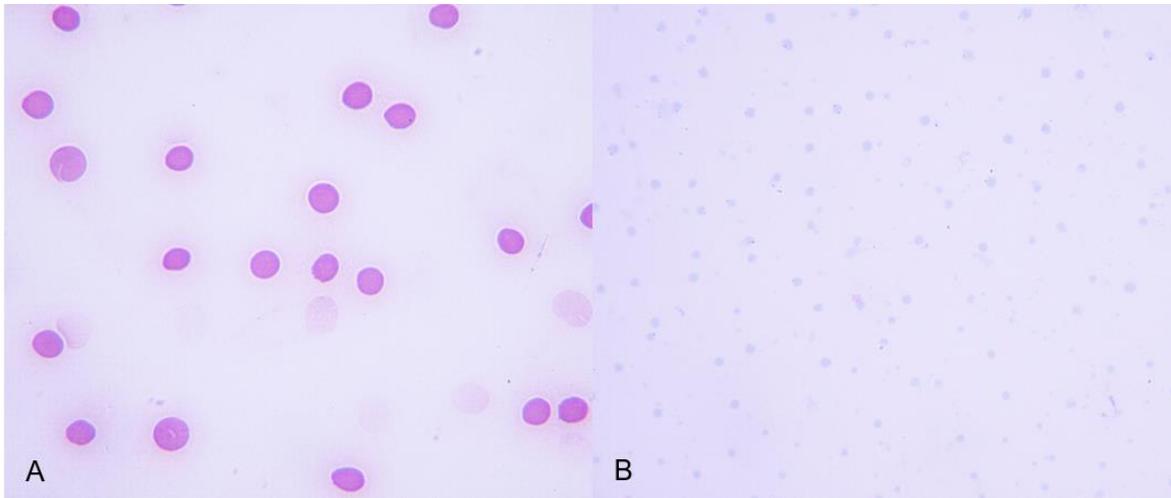


Figura 44. Dilución de 1:256

**Comparación de la observación microscópica del frotis de glóbulos rojos expuestos a una dilución de 1:256. A) Extracto etanólico de Neem. B) NaOCl al 5.25%.**

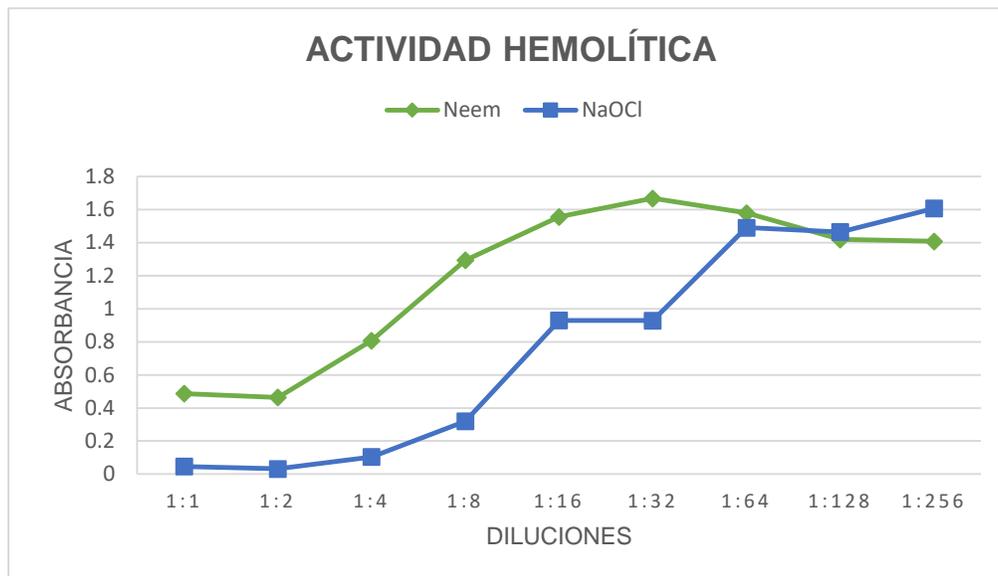
### 9.3. Análisis espectrofotométrico y estadístico

El sistema óptico del lector multipozo utiliza fibras que suministran luz a los pozos de la microplaca que contienen las muestras. La luz emitida por el lector de microplaca pasa por la muestra y su sistema de detección amplifica la luz desde la muestra y determina su absorbancia. De esta manera al medir la absorbancia de la hemoglobina libre en el sobrenadante determinamos el porcentaje de hemólisis. Estos valores fueron analizados mediante el programa estadístico IBM SPSS arrojando los resultados que se muestran a continuación (Tabla 4):

Diluciones	Extracto etanólico de Neem		NaOCl al 5.25%	
	Media	Desv estándar	Media	Desv estándar
1:1	.487	.03907	.0467	.02548
1:2	.4640	.28608	.0323	.00321
1:4	.8073	.18681	.1043	.04879
1:8	1.2930	.15301	.3193	.16406
1:16	1.5557	.6837	.9297	.07939
1:32	1.6673	.13467	.9290	.13061
1:64	1.5787	.10751	1.4903	.28679
1:128	1.4193	.10163	1.4647	.29140
1:256	1.4093	.03293	1.6070	.04557

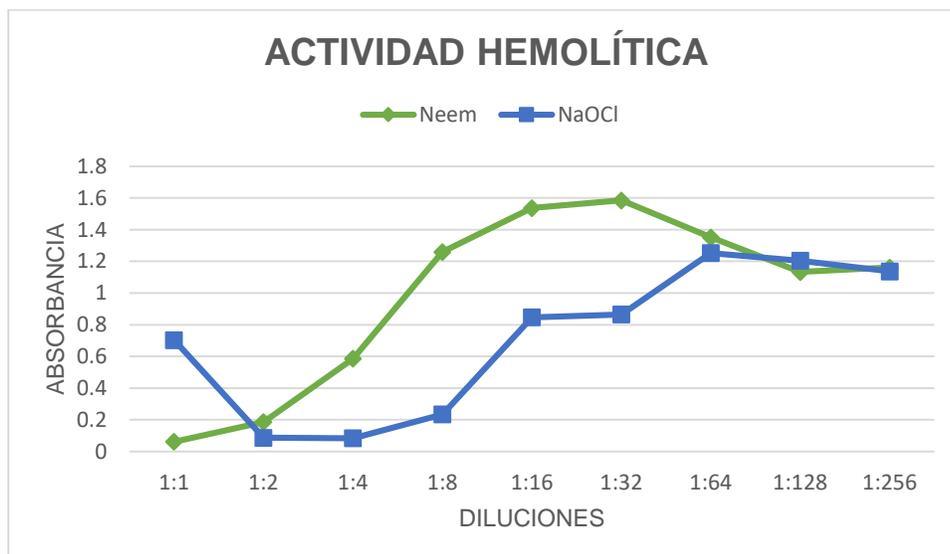
Tabla 4. Media con desviación estándar

En la tabla se muestra la media y desviación estándar de la absorbancia de cada una de las diluciones del extracto etanólico de Neem y el NaOCl al 5.25%.



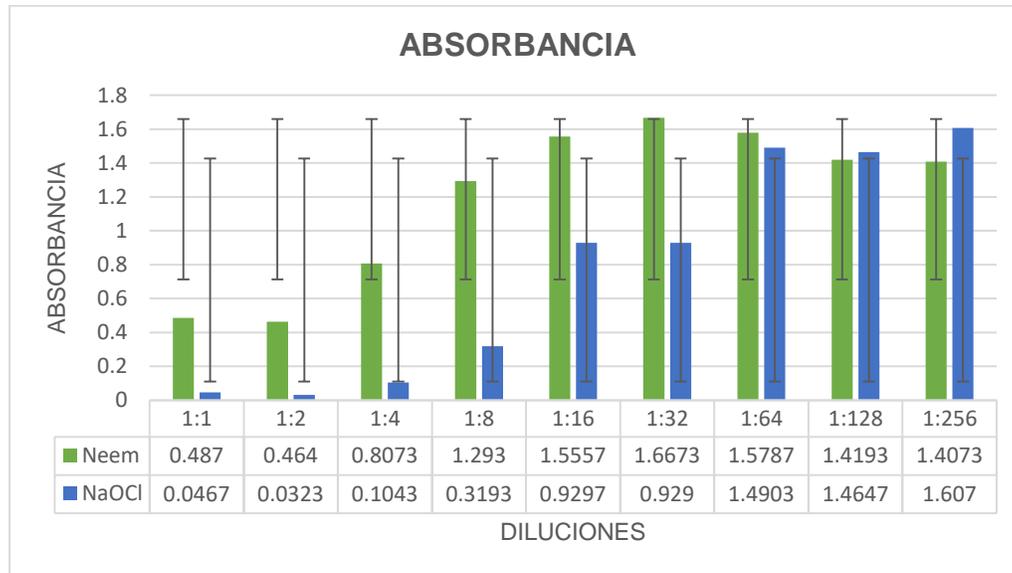
Gráfica 3. Actividad hemolítica inmediata

Gráfica representativa de la absorbancia del extracto etanólico de Neem a comparación del NaOCl.



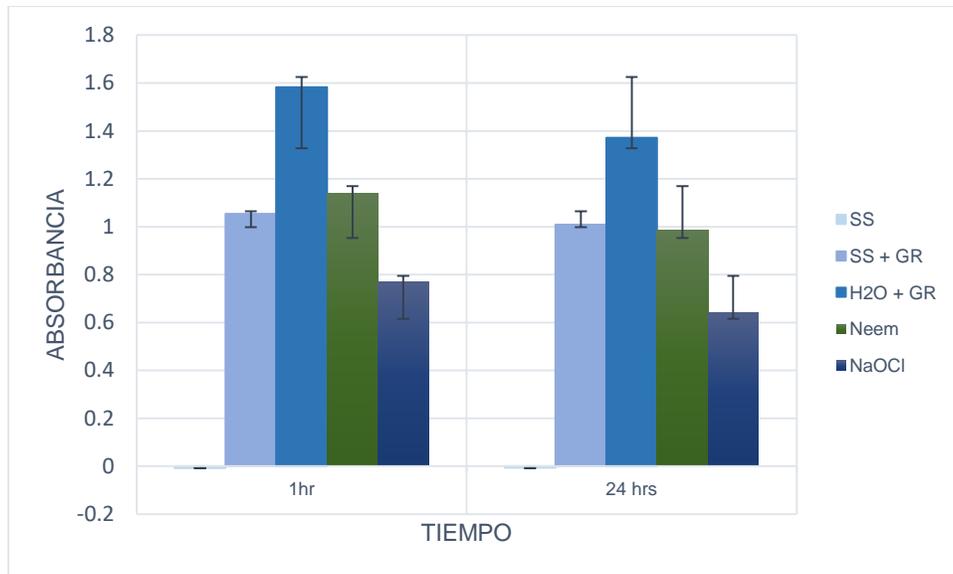
Gráfica 4. Actividad hemolítica a las 24 horas

**Resultado de la lectura de microplaca a las 24 horas, tanto el extracto etanólico de Neem y el NaOCl al 5.25% presentan cambios en las diluciones más altas y bajas mientras se mantiene similar en las diluciones de 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64.**



Gráfica 5. Comparación de la absorbancia del extracto de Neem contra el NaOCl al 5.25%

**Las barras representan el promedio de absorbancia de cada una de las diluciones del extracto etanólico de Neem y del NaOCl al 5.25% y las líneas verticales representan la desviación estándar.**



Gráfica 6. Absorbancia de todos los grupos

**Comparación gráfica de la absorbancia contra dilución y tiempo correspondientes a las soluciones de prueba. Las barras representan el promedio de absorbancia de cada uno de los grupos y las líneas verticales representan la desviación estándar.**

En la Gráfica 6 se muestran los resultados de absorbancia de la solución salina (SS) que se tomó como blanco), glóbulos rojos diluidos en solución salina (SS + GR) como control -, glóbulos rojos en agua destilada (H2O + GR) como control +, la media total de dilución del extracto etanólico de Neem y la media total de la dilución de NaOCl al 5.25%. En la que se puede observar que el grupo que presentó mayor absorbancia fue el de la dilución de glóbulos rojos en agua destilada debido a la hemólisis que produjo, a comparación con el NaOCl al 5.25% que aparte de hemolizar a los glóbulos rojos decoloró por completo la hemoglobina.

## X. DISCUSIÓN

La terapia endodóntica se basa principalmente en la eliminación de estímulos potencialmente nocivos del sistema de conductos radiculares, y la dinámica de la irrigación juega un papel muy importante durante el tratamiento debido a su actividad antimicrobiana (48).

El hipoclorito de sodio es el irrigante endodóntico más utilizado debido a sus múltiples cualidades, sin embargo, también tiene importantes desventajas como producir alguna reacción alérgica, toxicidad tisular, tinción de instrumentos, irritación del tejido periapical, e incapacidad para eliminar la capa de frotis y posee un olor y sabor indeseables (10). De igual manera, su variante, la clorhexidina, tiene el inconveniente del olor y sabor, toxicidad tisular y adicionalmente cuando se mezcla con NaOCl, produce un producto cancerígeno, la paracloroanalina (22).

Por esta misma razón, se ha planteado la búsqueda de nuevas soluciones de irrigación alternativas.

Durante miles de años, los seres humanos han estado utilizando remedios a base de hierbas para curar y prevenir diversas enfermedades. De muchos productos herbolarios, el Neem tiene numerosas propiedades que han promovido su uso tanto en el campo médico como dental (28).

Estudios realizados por *Ghonmode y cols.* en 2013 (38), *Chandrappa y cols.* en 2015 (42), *Babaji y cols.* en 2016 (40), así como, *Priya y cols.* en 2017 (41), han comprobado que el extracto acuoso y etanólico de Neem, utilizado como irrigante, posee una actividad antibacteriana similar a la del NaOCl. De igual manera, en el 2021, *Natarajam y cols.* en la Universidad Autónoma de Baja California, propusieron hacer un cotejo del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de Neem comparado con el NaOCl al 5.25% contra los microorganismos mayormente encontrados en las infecciones endodónticas: *E. faecalis* y *C. albicans* (45), confirmando así los resultados obtenidos por los autores anteriores.

El proceso de irrigación de los conductos radiculares conlleva un riesgo de extrusión del irrigante en los tejidos periapicales, que puede estar asociado con dolor, hinchazón y daño tisular (15). La citotoxicidad tisular es, por lo tanto, una preocupación importante al elegir un irrigante endodóntico para el tratamiento de conducto radicular.

Las investigaciones previas han documentado varios métodos para evaluar la citotoxicidad de los irrigantes endodónticos; *Pashley y cols.* en 1985 evaluaron la citotoxicidad del NaOCl mediante la hemoglobina corpuscular media de los glóbulos rojos (49). Por otro lado, *Zhang y cols.* en 2003 y *Faria y cols.* en 2007 evaluaron la citotoxicidad de la CHX y el MTAD respectivamente, utilizando fibroblastos L929 (50,51).

Con respecto al Neem, la literatura menciona que *Arévalo y cols.* en 2018 evaluaron la citotoxicidad mediante un ensayo de MTT en el que los resultados mostraron que el extracto acuoso del Neem no produjo efectos adversos en las líneas celulares MDCK (Madin Darby Canine Kidney) a bajas concentraciones (47).

El presente estudio experimental analizó la citotoxicidad del extracto etanólico de Neem mediante la comprobación de hemólisis de los glóbulos rojos, estos fueron elegidos como modelo biológico para evaluar los efectos citotóxicos ya que estas células se pueden aislar fácilmente utilizando un procedimiento menos invasivo y permite medir la hemoglobina intracelular mediante un análisis visual, microscópico, a través de la observación del frotis teñido, y el análisis espectrofotométrico de una manera sencilla y factible.

Los resultados permitieron determinar que a altas concentraciones el extracto etanólico de Neem tiene menor viabilidad, ya que produjo la aglomeración de los glóbulos rojos parcialmente degradados, mientras que el NaOCl los destruyó por completo.

Las membranas de glóbulos rojos son barreras semipermeables y el gradiente osmótico establecido a ambos lados de la membrana hace que el fluido fluya dentro

y fuera de las células. La cantidad de presión osmótica depende de la diferencia entre las concentraciones de iones no utilizables a cada lado de la membrana. Cuando las células se someten a una solución hipertónica, sufren un rápido flujo osmótico de agua que conduce a la crenación y finalmente al colapso. Por otro lado, en solución hipotónica, las células se hinchan y lisan liberando los constituyentes de las células en el medio de suspensión (48).

En el caso del NaOCl, este se disocia en ion hipoclorito y ácido hipocloroso que genera radicales superóxido que causan lesión oxidativa y muerte celular, causando la mayor toxicidad (48).

El porcentaje de hemólisis obtenido al medir la absorbancia de la hemoglobina libre en el sobrenadante determinó que el extracto etanólico de Neem y el NaOCl al 5.25% en las diluciones de 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 presentan diferencia estadísticamente significativa. Por lo cual, se puede decir que tienen un efecto citotóxico similar, a diferencia de los resultados obtenidos por *Sadashiv y cols.* en el 2019, en el que evaluaron la citotoxicidad del extracto etanólico del Neem mediante la hemoglobina corpuscular media de los eritrocitos adquiridos a partir de muestras sanguíneas, el cual mostró toxicidad tisular significativamente menor en comparación con el NaOCl y la CHX (48).

Nuestro análisis visual y microscópico fue similar a los resultados documentados por estos autores, en el que se demostró que el extracto etanólico del Neem afectó la integridad de los eritrocitos en todas las diluciones, sin embargo, no fueron destruidos por completo (Figura 42Figura 43Figura 44).

Los glóbulos rojos, a la dilución mínima de 1:256 en NaOCl al 5.25%, se observaron contraídos y decolorados, comprobando así un proceso de hemólisis al no existir presencia de hemoglobina, similar a los hallazgos documentados por *Pashley y cols.* quienes informaron que el NaOCl al 5,25%, en la dilución de 1:1000, causó hemólisis completa de glóbulos rojos in vitro (49).

Así mismo, análogo al resultado de *Arévalo y cols.* se confirmó que existe una correlación indirecta entre la concentración del irrigante y la viabilidad celular (47).

## **XI. CONCLUSIONES**

Se observó una disminución de la actividad hemolítica, a medida que disminuye la concentración de los extractos evaluados.

En el análisis visual y microscópico ambas soluciones, el extracto etanólico de Neem y el NaOCl al 5.25%, causaron efectos perjudiciales en los glóbulos rojos. Específicamente en las diluciones de 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, las soluciones presentan diferencia estadísticamente significativa. Por lo cual, se concluye que el extracto etanólico de Neem y el NaOCl al 5.25% tienen un efecto similar a las concentraciones presentes en dicha dilución.

Se espera que a futuro se logre ampliar la información sobre medicina tradicional que actualmente es escasa. Se requiere mayor investigación con respecto a la citotoxicidad del extracto crudo del Neem, de cada uno de sus componentes activos presentes y también estudios de las reacciones adversas.

## **XII. RECOMENDACIONES**

- Realizar ensayos de citotoxicidad con un mayor número de réplicas que permitan obtener resultados con mayor grado de confiabilidad.
- Evaluar si el extracto etanólico de Neem posee propiedades descalcificantes.
- Evaluar la profundidad de penetración del extracto etanólico de Neem en los túbulos dentinarios.
- Evaluar la actividad antiadherente del extracto etanólico de Neem contra los microorganismos.
- Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de Neem en órganos dentarios.
- Evaluar si existe alguna interacción entre el extracto etanólico de Neem con el NaOCl , CHX o EDTA al combinarlos.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ave NS. Glossary of Endodontic Terms Tenth Edition.
2. Ove A. Peters, Cristine I. Peters BB. Cleaning and shaping the root canal system. In: COHEN Pathways of the pulp. 12th editi. Barcelona, España: Elsevier; 2016. p. 209–79.
3. Soares, Ilson José. Goldberg F. El escenario. In: Endodoncia Técnica y Fundamentos. 2da Edició. Buenos Aires, Argentina: Ed. Panamericana; 2012. p. 25–8.
4. Fristad I, Berggreen E. Structure and functions of the dentin-pulp complex. In: COHEN Pathways of the pulp. 12th editi. Barcelona, España; 2016. p. 532–72.
5. Densply Sirona Protaper Gold [Internet]. 2021. Available from: <https://www.dentsplysirona.com/es-ib/productos/endodoncia/pro-taper-gold.html>
6. H S. Cleaning and shaping the root canal. Dent Clin North Am. 1974;18(269).
7. William J, Kulild JC, Tay F. Obturation of the cleaned and shaped root canal system. In: COHEN Pathways of the pulp. 12th editi. Barcelona, España; 2016. p. 280–322.
8. Whitworth J. Methods of filling root canals: principles and practices. 2005;(13):2–24.
9. Gutmann J, Hovland E. Problems in root canal obturation. Probl Solving Endod. 1997;92–116.
10. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. Endod Top. 2012;27:74–102.

11. Boutsoukis AC, Kishen A. Fluid dynamics of syringe- based irrigation to optimise anti-biofilm efficacy in root-canal disinfection. 2012;(Kishen 2010).
12. Senia E, Marshall F, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971;37(609).
13. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. 2001;424–8.
14. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the Effect of Dilution on the Necrotic Tissue Dissolution Property of Sodium Hypochlorite. 4(2).
15. Kishor N. Oral tissue complications during endodontic irrigation. *N Y State Dent J.* 2013;79(3):37–42.
16. Mohammadi Z, Abbott P V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. 2009;288–302.
17. Paquette L. The effectiveness of chlorhexidine gluconate as an intracanal medication in endodontics: an in vivo microbiological study. Univ Toronto, Canada. 2004;
18. Basrani B LC. Chlorhexidine Gluconate This article is based on a presentation to the Fourth. *Aust Endod J.* 2005;31(2):48.
19. Rølla G, Løe H SC. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *J Periodontal Res.* 1970;5:90.
20. Turesky S, Warner V, Lin PSUN. Prolongation of Antibacterial Activity of Chlorhexidine Adsorbed to Teeth \* by. *J Periodontol.* 1977;48:646–9.
21. Løe H. Does Chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental diseases? *J Periodontal Res.* 1973;12:93.

22. Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *J Endod.* 2007;33(8):966–9.
23. M. Hülsmann, M. Heckendorff UL. Chelating agents in root canal treatment : mode of action and indications for their use. *Int Endod J.* 2003;36:810–30.
24. Ultradent EDTA 18% Solution [Internet]. 2022. Available from: <https://www.ultradent.lat/products/categories/endodontics/irrigants-lubricants-medicaments/edta-18-solution?sku=162->
25. Goldman M, Kronman JH, Goldman LB, Clausen DMDH, Grady J. New method of irrigation during endodontic treatment. *J Endod.* 1976;2(Fig 2):257–60.
26. Torabinejad M. Irrigation solution and methods for use. 2003;25.
27. Montero D. Características de la planta de Neem [Internet]. 2021. Available from: <https://www.consejosparamihuerto.com/consejos/caracteristicas-de-la-planta-de-neem-azadirachta-indica/>
28. Singh H, Kaur M, Dhillon JS, Batra M, Khurana J. Neem: a magical herb in endodontics. *Stomatol Dis Sci.* 2017;1(2).
29. Venkateswara Rao Chava, SM Manjunath, AV Rajanikanth NS. The Efficacy of Neem Extract on Four Microorganisms Responsible for causing Dental Caries viz *S treptococcus mutans* , *Streptococcus salivarius* , *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguis* : An in vitro Study. *J Contemp Dent Pract.* 2012;13(December):769–72.
30. Siswomihardjo W, Badawi S, Nishimura M, Hamada T. The difference of antibacterial effect of neem leaves and stick extracts. *Int Chinese J Dent.* 2007;7:27–9.
31. Polaquini SRB, Svidzinski TIE, Kimmelmeier C. Effect of aqueous extract from Neem ( *Azadirachta indica* A . Juss ) on hydrophobicity , biofilm formation

- and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. *Arch Biol Oral*. 2006;51(6):482–90.
32. Pai MR, Acharya LD, Udupa N. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel — a 6-week clinical study. *J Ethnopharmacol*. 2004;90(1):99–103.
  33. Anirban Chatterjee, Mini Saluja, Nidhi Singh AK. To evaluate the antigingivitis and antipalque effect of an *Azadirachta indica* (neem) mouthrinse on plaque induced gingivitis: A double-blind, randomized, controlled trial. *J Indian Soc Periodontol*. 2011;15(4):398–401.
  34. Botelho MA, Araujo R, Martins JG, Carvalho O, Paz MC, Azenha C, et al. Efficacy of a mouthrinse based on leaves of the neem tree ( *Azadirachta indica* ) in the treatment of patients with chronic gingivitis : A double-blind , randomized , controlled trial. *J Med Plants Res*. 2008;2(11):341–6.
  35. Bhambal A, Kothari S, Manish S. Comparative effect of neemstick and toothbrush on plaque removal and gingival health – A clinical trial. *J Adv Oral Res*. 1942;2(3).
  36. Hussein S, Hussein H, Mohamed N, Mostafa A, Hegazy EM, Fayyad DM, et al. Comparative evaluation of the cytotoxic effect of different intracanal medicaments. *Dent Sci Updat*. 2021;2(2):123–33.
  37. Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R. K., & Bandyopadhyay U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr Sci*. 2002;82(11):1336–45.
  38. Ghonmode WN, Balsaraf OD, Tambe VH, Saujanya KP, Patil AK, Kakde DD. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. feacalis* - An in vitro study. *J Int oral Heal JIOH*. 2013;5(6):61–6.
  39. Arora T, Kang RS, Mann JS, Khurana NS, Aggarwal R WG. Antimicrobial

activity of herbal extracts against recalcitrant endodontic pathogens: an original in vitro study. *Saint's Int Dent J.* 2015;1(1):28.

40. Babaji P, Jagtap K, Lau H, Bansal N, Thajuraj S. Comparative evaluation of antimicrobial effect of herbal root canal irrigants ( *Morinda citrifolia* , *Azadirachta indica* , *Aloe vera* ) with sodium hypochlorite : An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6(3):196–9.
41. Daga P, Asrani H, Farista S, Mishra P. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Neem, Miswak, Propolis, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* using EndoVac. *Int J Prosthodont Restor Dent.* 2017;7(2):60–5.
42. Chandrappa PM, Dupper A, Tripathi P. Antimicrobial activity of herbal medicines ( *tulsi extract* , *neem extract* ) and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in Endodontics : An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5(2):89–92.
43. Dutta A, Kundabala M. Antimicrobial efficacy of endodontic irrigants from *Azadirachta indica*: An in vitro study. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(6):1594–8.
44. Dutta A, Kundabala M. Comparative anti-microbial efficacy of *Azadirachta indica* irrigant with standard endodontic irrigants : A preliminary study. *J Conserv Dent.* 2014;17(2):133–7.
45. Ganesh Natarajam. Evaluación del efecto antimicrobiano del hipoclorito de sodio al 5.25% y *Azadirachta Indica* frente a *Enterococcus Faecalis* y *Candida Albicans*. 2021.
46. Meza JB, Álvarez JC, Forero JF, Wilches MCG. Evaluación de la citogenotoxicidad in vitro en eritrocitos y linfocitos humanos de los extractos de *Croton niveus*, *Piper marginatum* e *Hyptis suaveolens*, especies vegetales utilizadas en medicina tradicional del Departamento del Atlántico en el año

2016. 2016;

47. Lucia Arevalo-Híjar, Miguel Angel Aguilar-Luis, Stefany Caballero-García, Nestor Gonzáles-Soto JDV-M. Antibacterial and Cytotoxic Effects of *Moringa oleifera* ( Moringa ) and *Azadirachta indica* ( Neem ) Methanolic Extracts against Strains of *Enterococcus faecalis*. *Int J Dent*. 2018;2018.
48. Daokar SG, Mahakale CR, Pawar KS, Wahane KD, Thorat T V. Comparative Evaluation of Cytotoxicity of Herbal and Nonherbal Endodontic Irrigants on Human Red Blood Corpuscles – An In Vitro Study. *J Aesthetic Dent Conserv Dent Endod*. 2020;1(November 2019).
49. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic Effects of NaOCl on Vital Tissue Efecto Citotoxico del NaOCl en el Tejido Vital. *J Endod*. 1985;11(12):525–8.
50. Faria G, Celes MRN, Rossi A De. Evaluation of Chlorhexidine Toxicity Injected in the Paw of Mice and Added to Cultured L929 Fibroblasts. *J Endod*. 2007;33(6):715–22.
51. Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of Cytotoxicity of MTAD Using the MTT-Tetrazolium Method. *J Endod*. 2003;29(10):654–7.