

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



**"INACTIVACIÓN DE ENDOTOXINAS (LPS) EMPLEANDO
HIPOCLORITO DE SODIO AL 6% (NAOCL 6%), ÁCIDO
HIPOCLOROSO (HOCl) Y MEDICACIÓN INTRACONDUCTO A
BASE DE HIDRÓXIDO DE CALCIO Ca(OH)_2 "**

**TÉSIS COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA

DULCE YICEL MAGAÑA MANCILLAS

PRESIDENTE

DR. MIGUEL ÁNGEL CADENA ALCÁNTAR

SINODALES

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ
DR. LUIS ALBERTO GAITÁN CEPEDA
DRA. MARÍA NICOLASA RENTERÍA AGUILERA
DRA. ALICIA PERCEVAULT MANZANO

TIJUANA BAJA CALIFORNIA, ENERO 2016

ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
1.INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 ANTECEDENTES.....	5
1.2MARCO TEÓRICO.....	13
1.2.1BACTERIAS GRAMNEGATIVAS Y LIPOPOLISACÁRIDOS.....	13
1.2.1.1MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.....	13
1.2.1.2COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL LPS.....	13
1.2.1.3TOXICIDAD DE ENDOTOXINAS.....	14
1.2.1.4MECANISMOS DE ACCIÓN DE ENDOTOXINAS.....	16
1.2.1.5.BACTERIAS GRAMNEGATIVAS EN EL CONDUCTO RADICULAR.....	16
1.2.1.6INFLUENCIA DE ENDOTOXINAS SOBRE OSTEOCLASTOGENESIS.....	18
1.2.1.7INACTIVACIÓN DE ENDOTOXINAS EN EL TRATAMIENTO ENDODÓNTICO.....	18
1.2.1.8 INACTIVACIÓN DE ENDOTOXINAS A TRAVÉS DE MEDICACIÓN INTRACONDUCTO A BASE DE HIDRÓXIDO DE CALCIO.....	20
1.2.2IRRIGACIÓN DEL CONDUCTO RADICULAR.....	21
1.2.2.1 HIPOCLORITO DE SODIO (NaOCI).....	22
1.2.2.2.ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl).....	23
1.2.2.3MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO.....	23
1.2.2.4 APLICACIONES DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO.....	23
1.2.2.5BIOCOMPATIBILIDAD DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO.....	24
1.2.3 PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS PARA DETECTAR ENDOTOXINAS.....	24
1.2.3.1 PYROSATE®:PRUEBA RÁPIDA DE DETECCIÓN DE ENDOTOXINAS.....	25
1.2.3.2.SENSIBILIDAD.....	26
1.2.3.3REALIZACIÓN DE PRUEBA.....	26
1.2.3.4.RECONSTITUCIÓN.....	26
1.2.3.5 ESTABILIDAD.....	27
1.2.3.6APLICACIONES DEL PRODUCTO.....	27
1.2.3.7BENEFICIOS DEL PRODUCTO.....	28
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
4 HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	33
6.VARIABLES.....	34
6.1DEPENDIENTES.....	34
6.2 INDEPENDIENTES.....	34
6.3OPERACIÓN DE VARIABLES.....	35
7.MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
7.1TIPO DE ESTUDIO.....	36
7.2 UNIVERSO DE ESTUDIO.....	36
7.3 CRITERIOS.....	36
7.3.1 INCLUSIÓN.....	36
7.3.2 EXCLUSIÓN.....	36
7.4 MATERIALES.....	37
7.5 METODOLOGÍA.....	39
7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
8. RESULTADOS.....	50
9. DISCUSION.....	55
	10.

CONCLUSIÓN.....	57
11.	
BIBLIOGRAFÍA.....	58
AGRADECIMIENTOS.....	62
ANEXOS.....	63

RESUMEN

INACTIVACIÓN DE ENDOTOXINAS (LPS) EMPLEANDO HIPOCLORITO DE SODIO AL 6% (NaOCl 6%), ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl) Y MEDICACIÓN INTRACONDUCTO A BASE DE HIDRÓXIDO DE CALCIO Ca(OH)_2

El propósito de este estudio fue evaluar la eficiencia en la inactivación de endotoxinas (LPS) en discos de dentina de bovino, empleando hipoclorito de sodio (NaOCl 6%), una solución de ácido hipocloroso (HOCl) y medicación intraconducto a base de hidróxido de calcio (Ca(OH)_2).

90 discos de dentina de bovino fueron esterilizadas y divididos en 3 grupos (grupo A, B y C) y fueron inoculados con LPS de E. coli. Grupo A fue tratado con NaOCl al 6% y Grupo B con HOCl por 40 minutos. El Grupo C fue tratado con medicación intraconducto a base de Ca(OH)_2 y colocados en contenedores estériles e incubados en el horno a una temperatura de 37°C por 7 días. Las muestras tratadas fueron enjuagadas y colocadas en recipientes estériles con 1 ml de agua estéril y fueron incubados por 24 horas. La presencia de endotoxinas en el agua en contacto con las muestras fue determinada por la formación o ausencia de un coágulo utilizando Pyrosate®, una prueba rápida de detección de endotoxina en agua. Los datos fueron analizados empleando la prueba estadística Chi cuadrada. ($p < 0.05$) La presencia de LPS se observó en los grupos A, B. En el grupo C no se observó presencia de LPS. El grupo C mostró una diferencia estadísticamente significativa en inactivación de LPS comparado con los grupos A y B. En este estudio se observó que la medicación intraconducto a base de Ca(OH)_2 es más efectiva que la irrigación con NaOCl al 6 % y el HOCl

PALABRAS CLAVE: Endotoxina, LPS, Hidróxido de Calcio

ABSTRACT

ENDOTOXIN (LPS) INACTIVATION USING 6% SODIUM HYPOCHLORITE (6% NaOCl), HYPOCHLOROUS ACID (HOCl) AND CALCIUM HYDROXIDE INTRACANAL MEDICATION Ca(OH)_2

The aim of the present study was to evaluate the effectiveness in the inactivation of endotoxins (LPS) in bovine dentin disks, using 6% sodium hypochlorite (NaOCl), hypochlorous acid (HOCl) and intracanal medication as calcium hydroxide (Ca(OH)_2). 90 bovine dentin disks were standardized in 5 mms cylindrical disks. The samples were sterilized. The bovine dentin disks were divided in 3 groups of 30 samples each (A, B and C) were contaminated with LPS E. coli. Group A was treated with 6% NaOCl for 40 minutes, group B was treated with HOCl. Group C was treated with intracanal medication of Ca(OH)_2 and placed in sterile containers in the oven at a temperature of 37 ° C for 7 days. When the time of exposure finish the samples were rinsed to remove traces and inactivate the agent irrigant. All the treated samples were placed in containers with 1 ml of sterile water and were incubated for 24 hrs. LPS inactivation was determined by the presence or absence of color using Pyrosate® an endotoxin testing for water. Data were statistically analyzed using Chi Square test. Presence of LPS was observed in group A and B. Group C, there was no presence of LPS. A statistically significant difference was noted between group C and groups A, B. ($p < 0.05$) In this study it was observed that using Ca(OH)_2 as intracanal medication is more effective for endotoxin inactivation than the irrigation with 6% NaOCl or HOCl.

KEYWORDS. Entotoxin, LPS, calcium hydroxide

1 Introducción

Los microorganismos juegan un papel muy importante para el desarrollo de la enfermedad pulpar y periapical, por tal motivo son una constante preocupación en la especialidad de endodoncia y esto se ve demostrado a través de muchas investigaciones realizadas.

Uno de los objetivos del tratamiento endodóntico es la completa eliminación de estos microorganismos presentes en los conductos radiculares, lo que ha llevado al desarrollo de técnicas de instrumentación mecánica, estudio de diversas soluciones de irrigación, evaluación de diversos medicamentos intraconducto, aplicación de nuevas tecnologías para alcanzar este objetivo.

En la infección endodóntica primaria hay infecciones mixtas, pero dentro de ella predominan microorganismos gramnegativos anaerobios, mientras que las bacterias asociadas con infecciones secundarias comprometen a solo unas cuantas especies.

El éxito del tratamiento en ambos casos de infección endodóntica involucra la efectiva erradicación de los microorganismos causantes durante los procedimientos del tratamiento de conductos radiculares.

Los microorganismos gramnegativos presentes en la infección endodóntica primaria poseen diferentes factores de virulencia, estos forman productos y subproductos tóxicos a los tejidos pulpares y periapicales. Esta patogenicidad es debido a la presencia de un elemento de la pared celular llamado Endotoxina.

La endotoxina consiste en un complejo lipopolisacárido (LPS), el cual es liberado durante la multiplicación celular bacteriana o por la muerte de la célula bacteriana. Esta puede quedar biológicamente activa teniendo efectos nocivos a los tejidos perirradiculares.

La preparación mecánica del sistema de conductos radiculares por si sola reduce significativamente los microorganismos presentes en el conducto radicular. Sin embargo existen áreas inaccesibles a los instrumentos como istmos, ramificaciones, deltas, túbulos dentinarios. Por lo cual es necesario el empleo de irrigantes

antimicrobianos para eliminar las bacterias presentes en estas áreas y de la colocación de medicamentos intraconducto para poder eliminar bacterias persistentes en el conducto y además inactivarla toxicidad del LPS.

Por lo que el éxito del tratamiento de casos de infección endodóntica involucra la efectiva erradicación de los microorganismos causantes y sus productos, durante los procedimientos de limpieza y conformación.

A través de investigaciones In Vivo e In Vitro se ha observado que la utilización del Hidróxido de Calcio como medicamento intraconducto es capaz de inactivar al LPS.

El Hipoclorito de Sodio es la solución irrigante más utilizada en el tratamiento de conductos y sobre todo debido a la alta capacidad antimicrobiana cuando es utilizado en altas concentraciones. Sin embargo, el empleo de este a altas concentraciones es un riesgo muy discutido debido a su alto potencial de toxicidad.

En la búsqueda de nuevos y mejores agentes irrigantes en endodoncia, se ha introducido el empleo del Ácido Hipocloroso, este se deriva de un grupo de soluciones conocidas como soluciones electroquímicamente activas. Diversos estudios han demostrado que posee propiedades antimicrobianas y una gran biocompatibilidad, lo cual crea la necesidad de su evaluación para poder recomendar su uso en el tratamiento de conductos radiculares.

Numerosas investigaciones han empleado la prueba LAL (lisado de amebocitos de Limulus) para determinar la presencia de endotoxinas en el tejido pulpar. El cual ha sido de gran ayuda para evaluar diversos medicamentos y agentes irrigantes en su capacidad de detoxificar endotoxinas en el área de endodoncia.

El propósito de este estudio es comparar la utilización de la medicación intraconducto con Hidróxido de Calcio por siete días previa irrigación, el empleo del Hipoclorito de Sodio a una concentración de 6% y una solución de reciente aparición como lo es el Ácido Hipocloroso en sus efectos sobre la inactivación de endotoxinas en discos de dentina de bovino.

1.1 Antecedentes

Maekaga en el 2011, publicó un estudio cuyo objetivo fue evaluar el efecto de sustancias químicas auxiliares de la preparación biomecánica y la medicación intraconducto sobre *Escherichia coli* y sus endotoxinas dentro del conducto radicular. Se utilizaron 120 dientes que fueron contaminados con una suspensión de *Escherichia coli* durante 14 días. Los dientes fueron divididos en tres grupos de acuerdo con la sustancia química usada; Hipoclorito de Sodio al 2.5 (grupo 1), Clorhexidina al 2% (grupo 2), solución libre de pirógenos (grupo 3). Después estos grupos fueron subdivididos de acuerdo a la medicación intraconducto que se colocó; A) Pasta de Hidróxido de Calcio (Calen), B) Polimixina B y C) Pasta de Hidróxido de Calcio y Clorhexidina en gel al 2%. Para el grupo control (Grupo 4) solución salina libre de pirógenos fue empleada sin la colocación de medicación intraconducto. Se tomaron muestras al terminar la preparación biomecánica, a los 7 días después, a los 14 días de la actividad del medicamento intraconducto y 7 días después de remover el medicamento intraconducto. Los siguientes aspectos fueron evaluados en todas las muestras: A) actividad antimicrobiana y B) cuantificación de endotoxinas por medio del test *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). Los resultados de este estudio demostraron que el Hipoclorito de Sodio al 2.5% y la Clorhexidina son capaces de eliminar *Escherichia coli* del conducto radicular y reducir la carga de endotoxina en comparación del grupo donde se irriego con solución salina. Se concluyó que el Hipoclorito de Sodio al 2.5% y la Clorhexidina son efectivos para eliminar *Escherichia coli* pero solamente la colocación medicamento intraconducto reduce de manera significativa las endotoxinas presentes en el conducto radicular independientemente del agente de irrigación empleado.¹

En el 2009, Gomes y cols, realizaron un estudio clínico para comparar la eficacia de la instrumentación del conducto radicular con Hipoclorito de Sodio al 2.5% (NaOCl) y con Clorhexidina (CHX) en gel al 2%, sobre la eliminación de lipopolisacarido de bacterias

orales presentes en el conducto radicular de dientes con pulpa necrótica. 54 conductos radiculares fueron seleccionados para este estudio, Las muestras fueron tomadas antes de realizar la instrumentación de conducto radicular por medio de puntas de papel (muestra 1) y después de la preparación se tomó otra muestra (muestra 2). Los dientes fueron divididos en dos grupos de manera aleatoria. En el grupo I fue tratado con Hipoclorito de Sodio al 2.5% (NaOCl) y el grupo II donde se empleó Clorhexidina (CHX). Las muestras fueron sometidas a la prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) para poder obtener la cuantificación de endotoxinas. Los resultados mostraron que el 100% de todas las muestras tenían endotoxinas presentes. En el grupo I la mediana fue de 272 EU/ ml y en el grupo II fue de 152.46 EU/ml. Después de la preparación biomecánica del conducto radicular se observó una reducción endotoxinas obteniendo valor de mediana de 16 EU/ml en el grupo I y de 85 en el grupo II. El Hipoclorito de Sodio presentó un porcentaje más alto de eliminación de endotoxinas en comparación con la Clorhexidina al 2% en gel. Por medio de este estudio clínico se concluyó que el empleo de Hipoclorito de Sodio al 2.5% y de la Clorhexidina al 2% en gel no son efectivos en la eliminación de endotoxinas en el tratamiento de dientes con infección endodóntica primaria.²

Martinho y cols, en el 2010 realizaron un estudio clínico para investigar la capacidad de la preparación quimiomecánica con Hipoclorito de Sodio al 2.5, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 17% e instrumentos rotatorios de Níquel-Titanio (NiTi), sobre la remoción de endotoxinas conductos radiculares con infección endodóntica primaria con periodontitis apical. Para lo cual emplearon veintinueve conductos radiculares con pulpa necrótica. Se tomaron muestra antes de instrumentar los conductos radiculares introduciendo puntas de papel estériles. Después de obtener la conductometría, instrumentar el conducto radicular empleando el sistema rotatorio Mtwo, en donde entre el trabajo de cada lima irriego con 5 ml de Hipoclorito de Sodio al 2.5. Se inactivo el Hipoclorito de Sodio aplicando 5 ml de Tiosulfato de Sodio por 5 minutos. Se removió el lodillo dentinario enjuagando con EDTA al 17% durante tres minutos y se dio un enjuague final con 5 ml de solución salina. Se tomó la segunda muestra colocando una punta de papel estéril dentro del conducto instrumentado. Las muestras fueron sometidas a la prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus para la

cuantificación de endotoxinas. Los resultados arrojaron que el 100% de los conductos radiculares se encontraban contaminados con la presencia de endotoxinas antes de la preparación biomecánica del conducto radicular. Después de la preparación quimiomecánica se encontró una reducción de la cuantificación de endotoxinas en la muestra 2 (98.06%) comparada con la muestra 1. (p. <0.05). La conclusión de este estudio indica que la preparación quimiomecánica de conductos radiculares con Hipoclorito de Sodio al 2.5%, EDTA al 17% e instrumentos rotatorios NiTi fue efectiva en la reducción de la cantidad de endotoxina en los conductos radiculares con infección endodóntica primaria con periodontitis apical.³

Tanomaru en el 2003, realizó un estudio en cortes histológicos de dientes de perros, donde el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes soluciones irrigantes empleadas durante la preparación biomecánica del conducto radicular y la medicación intraconducto con Hidróxido de Calcio en la inflamación periapical inducida por el LPS. Para este estudio se emplearon 140 raíces de premolares de perros, las cuales fueron inoculadas con LPS de Escherichia coli durante diez días. Se procedió a la preparación biomecánica de los conductos radiculares en los cuales se dividieron en grupos de 20 raíces. Las soluciones empleadas fueron NaOCl al 1% (grupo I), NaOCl al 2.5% (grupo II), NaOCl al 5% (grupo III), Digluconato de Clorhexidina (grupo IV), Solución Fisiológica. (Grupo V). La solución de LPS se mantuvo en los dientes del grupo VI. La irrigación con solución fisiológica y la colocación de medicamento intraconducto fue empleada en el grupo VII. En los resultados de este estudio se observó en la evolución histopatológica que los grupos I-VI se presentó una mayor presencia de infiltrado inflamatorio, engrosamiento del ligamento periodontal y una gran resorción cementaria y ósea comparados con el grupo VII, el cual recibió la medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio. Por lo que la conclusión de este estudio es que la preparación biomecánica y el empleo de soluciones irrigantes no son capaces de inactivar los efectos de las endotoxinas, sin embargo la medicación intraconducto de Hidróxido de Calcio parece inactivar los efectos inducidos por las endotoxinas in vivo.⁴

Buck y cols en el 2001, realizaron un estudio sobre el efecto de diversas soluciones de irrigación y la medicación intraconducto a base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sobre el lipopolisacárido (LPS; endotoxina), en una solución acuosa de LPS se mezcló con uno o varios agentes irrigantes. Entre estos agentes irrigantes se incluyeron: NaOCl al 2.65%, Clorhexidina al 0.12 (Periodex), EDTA al 15% (RC Prep), etanol, una combinación de NaOCl, Clorhexidina y etanol, cloruro de Clorhexidina (NaOCl combinado con Clorhexidina) e Hidróxido de Calcio en suspensión acuosa. Y un grupo control donde se utilizó agua libre de pirógenos. Los agentes irrigantes fueron aplicados durante 30 minutos y la solución acuosa de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ durante 1, 2 y 5 días simulando el tiempo que es colocado como medicamento intraconducto. La inactivación de LPS fue medida por medio de la cuantificación de liberación ácidos grasos libres encontrados en la muestras. El agua, EDTA, etanol, Clorhexidina al 0.12%, NaOCl y la combinación de NaOCl y Clorhexidina demostraron nula o muy poca ruptura del LPS. La combinación de NaOCl, Clorhexidina y etanol en un tiempo de 30 minutos, mostraron un efecto similar al del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en un tiempo de 1 día. Los resultados de este estudio demostraron que la porción biológicamente activa del LPS, el lípido es hidrolizado por medio de sustancias químicas altamente alcalinas como el $\text{Ca}(\text{OH})_2$.⁵

En Japón durante el año de 1996 Hata y cols, motivados por estudios que mostraron la eliminación de bacterias y virus sin dañar tejidos vivos al utilizar soluciones potencialmente oxidativas decidieron investigar la habilidad de las soluciones potencialmente oxidativas en la remoción del lodo dentinario en conductos radiculares, observado bajo el microscopio electrónico de barrido. En este estudio se encontró que las soluciones potencialmente oxidativas empleadas como irrigante durante y después de la instrumentación del conducto radicular es efectivo como el empleo de Hipoclorito de Sodio al 5% o EDTA al 17% para la limpieza y apertura de los tubulillos dentinarios.⁶

Oliveira en el 2012, realizó un estudio con el objetivo de evaluar los efectos en el tratamiento endodóntico sobre las endotoxinas en diferentes tiempos de instrumentación empleando varios agentes irrigantes en conductos con necrosis pulpar. Estudio 36 conductos radiculares dividiéndolos en tres grupos, utilizando las siguientes combinaciones de agentes irrigantes: gel de clorhexidina+ Agua de lima; Clorhexidina +

Hidróxido de Calcio + Agua de lima; clorhexidina + Polimixina B; y tomo muestras en diferentes después de irrigar, después de colocar EDTA y otra muestra después de medicar con Hidróxido de Calcio por 14 días. Como resultados obtuvo que los agentes irrigantes reducen después de la instrumentación de un 90 a 96% de reducción de endotoxinas presentes antes de la instrumentación y que la colocación de medicación intraconducto logró una reducción del 92 al 100% de las endotoxinas presentes después de la instrumentación.⁷

Marais en el 2000 comparó la eficacia en la limpieza en las paredes del conducto radicular utilizando una solución electroquímicamente activada e Hipoclorito de Sodio. Para esto se instrumentó conductos radiculares de dientes extraídos, los cuales fueron divididos en dos grupos, realizando la irrigación con una de las soluciones y teniendo un grupo control, el cual no recibió ningún tratamiento con alguna de las soluciones. Todos los dientes fueron seccionados y observados bajo el microscopio electrónico de barrido. Los resultados demostraron que las paredes de los conductos radiculares se encontraban cubiertas con detritus y bacterias. El Hipoclorito de Sodio produjo una limpieza en las superficies con túbulos dentinarios abiertos y en algunas áreas se observó la obstrucción de ellos por la presencia de lodo dentinario en donde fueron visibles bacterias inmersas. En los conductos radiculares de los dientes tratados con soluciones electroquímicamente activadas, se observó que hubo una mayor remoción de lodo dentinario en áreas muy extensas. Por lo cual se concluyó a través de este estudio que la eficacia de la limpieza de la solución electroquímicamente activada fue considerada superior al Hipoclorito de Sodio.⁸

Soloveyva, en el 2000 realizó un estudio piloto cuyo objetivo fue evaluar el potencial de limpieza en la eliminación de lodo dentinario de las soluciones electroquímicamente activas (ECA) para limpiar los conductos radiculares durante la instrumentación convencional del conducto radicular. Veinte dientes unirradiculares humanos, fueron asignados al azar en 4 grupos de 5 dientes. Se realizó acceso a la cámara pulpar y los conductos instrumentados manualmente con los limas convencionales de acero inoxidable. Uno u otro de los irrigantes siguiente fue utilizado durante la preparación: agua destilada, 3% NaOCl, anolito neutral catódica (ANC) (300 mg / L de cloro activo),

y una combinación de anolito neutral catódica (ANC) (300 mg / L de cloro activo) y el catolito. Los dientes fueron seccionados longitudinalmente para examinar las paredes del conducto por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las microfotografías fueron tomadas por separado en la parte coronal, medio y apical del conducto con un aumento de x800 para evaluar el desbridamiento de la matriz extracelular y en un aumento de X2500 para evaluar la presencia de lodo dentinario. En los conductos que fueron irrigados con agua destilada se observó que no hubo remoción de los escombros en la parte apical de los conductos y se observó la presencia de una capa de lodo dentinario. Todas las soluciones electroquímicamente activas demostraron un poseer potencial para mejorar la limpieza del conducto radicular en comparación con agua destilada. La calidad de la eliminación de los residuos sueltos fue similar para NaOCl y la solución de anolito ANC. La combinación de anolito y catolito ANC resultó en una mejor limpieza, especialmente en el tercio apical de los conductos. En la evaluación del lodo dentinario demostrado que ninguno de los irrigantes son eficaces en su eliminación total; Sin embargo, irrigantes químicamente activos afectados en su superficie y espesor. También es importante tener en cuenta que se observó el aumento en la apertura de los túbulos dentinarios utilizando NaOCl, sobre todo en los tercios coronal y medio de los canales, mientras que la combinación de ANC y catolito demostró un mayor número de túbulos dentinarios abiertos durante todo el eje longitudinal de los conductos irrigados. Por lo cual se concluyó que con las soluciones electroquímicamente activadas se puede obtener una efectiva limpieza de las paredes del conducto radicular y puede ser una alternativa a NaOCl en el tratamiento del conducto radicular.⁹

Gulabivala en el 2004, probó la efectividad de las soluciones electroquímicamente activadas para la erradicación de biofilm de *Enterococcus Faecalis* en conductos radiculares de dientes extraídos. Se utilizaron 198 dientes humanos extraídos, unirradiculares. Estos fueron designados al azar en ocho grupos. Después de retirar la corona de los ejemplares, los conductos radiculares fueron instrumentados a un calibre estándar. Los dientes fueron esterilizados por medio de autoclave y después fueron inoculados con biofilm de *Enterococcus faecalis*. Diferentes tipos de soluciones electroquímicamente activadas fueron utilizadas para irrigar los conductos radiculares

y se utilizó Hipoclorito de Sodio al 3% activado ultrasónicamente. Los resultados arrojados por este estudio fue que las soluciones electroquímicamente activadas no fueron más eficaces a la utilización del NaOCl en la eliminación de bacterias.¹⁰

En el 2010 García y cols, realizaron un estudio cuyo propósito fue medir y evaluar la efectividad del Aquatine Endodontic Cleanser (Aquatine EC) en la limpieza del conducto radicular y remoción de lodo dentinario, cuando es utilizado como una solución irrigante en endodoncia en comparación al Hipoclorito de Sodio al 6%. Se utilizaron cuarenta y cinco dientes humanos, los cuales fueron divididos en cinco grupos de tratamiento. Se les realizó acceso endodóntico y fueron instrumentados utilizando instrumentos rotatorios Protaper y Profile hasta un calibre # 40. Los dientes fueron procesados para ser observados bajo el microscopio electrónico de barrido, la limpieza del conducto radicular y la remoción de lodo dentinario fue evaluada. Los resultados mostraron una efectiva remoción de lodo dentario al utilizar Aquatine EC e Hipoclorito de Sodio, pero acompañado de un enjuague de EDTA. Por lo cual con este estudio se llegó a la conclusión de que el Aquatine EC, la primera solución de Ácido Hipocloroso aprobada por la FDA se presenta como una posible alternativa al uso del Hipoclorito de Sodio como agente irrigante intraconducto.¹¹

En el 2011 Rossi y cols, realizaron un estudio cuyo objetivo era comparar la acción antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* del NaOCl, Optident Sterilox solución electrolítica y Aquatine Sterilox Alpha de electrolitos, cuando se utilizaban como soluciones de irrigación en un modelo de discos de dentina bovina. Las secciones de la raíz se prepararon y se inocularon con *E. faecalis*. Después de 10 días de incubación de los conductos radiculares fueron irrigados con una de las tres soluciones (NaOCl, Optident Sterilox solución electrolítica y Aquatine Sterilox Alpha de electrolitos) y posteriormente, se realizó un tallado sobre las paredes del conducto para obtener virutas de dentina. Las virutas de dentina se colocaron en un caldo de BHI, posteriormente las diluciones se sembraron en placas de agar fresco para cuantificar el crecimiento. Los resultados obtenidos fueron los siguientes el Hipoclorito de Sodio fue el único irrigante capaz de eliminar todas las bacterias. Aun cuando las diluciones se hicieron, el NaOCl seguía siendo estadísticamente superior a los otros dos irrigantes.

Aquatine Sterilox Alpha fue superior a la solución de Optident Sterilox. A través de este estudio se llegó a la conclusión de que Aquatine Sterilox posee una acción antimicrobiana superior a la solución Optident Sterilox, sin embargo el NaOCl fue la única solución irrigante capaz de erradicar sistemáticamente *E. faecalis* en el modelo de dentina bovina.¹²

La Faurie y cols en el 2009, evaluaron la eficacia antimicrobiana del Ácido Hipocloroso sobre microorganismos con potencial patogénico en cavidad oral. Se evaluó la efectividad antimicrobiana y antifúngica del Ácido Hipocloroso en concentraciones de 125, 250, 500, 1000 y 1500 ppm a diferentes tiempos de acción: 1, 5, 10 y 15 minutos, sobre diferentes cepas bacterianas ATCC y sobre *Cándida albicans* ATCC 90028. Se empleó la técnica de Kelsey Maurer, verificando la presencia o ausencia de unidades formadoras de colonias (UFC). Cada ensayo se realizó por triplicado con sus respectivos controles de viabilidad. Se logró inhibición bacteriana a una concentración de 500 ppm durante 1 minuto para *S. sanguis*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. corrodens*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *E. cloacae*, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*. Los resultados indican que el Ácido Hipocloroso se constituye como una alternativa antimicrobiana para bacterias con capacidad patogénica en la cavidad oral. En el caso de la *C. albicans* se inhibió a una concentración de 500 ppm por 10 minutos, lo que indica bajo poder antifúngico. La Faurie recomendó realizar más estudios clínicos para evaluar la efectividad del Ácido Hipocloroso in vivo.¹³

1.2 Marco Teórico

1.2.1 Bacterias Gramnegativas y Lipopolisacáridos

Las bacterias cuentan poseen paredes celulares, las cuales les ayudan a resistir presiones y evitar la lisis celular. Estas paredes son las responsables de la forma y la rigidez de la célula bacteriana. De acuerdo a las características de la pared celular las bacterias se dividen en dos grupos: grampositivas y gramnegativas. La distinción inicial entre estos dos tipos se basa en la tinción de Gram, pero la diferente reacción a esta tinción se basa en las diferencias que existen en la estructura de las paredes celulares. Las paredes celulares de las grampositivas y de las gramnegativas muestran diferencias notables por microscopía electrónica.¹⁴

1.2.1.1 Membrana externa de bacterias Gramnegativas

En las bacterias gramnegativas la pared celular es una estructura compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que en las grampositivas es generalmente más ancha y está formada fundamentalmente por un solo tipo de molécula.

En las bacterias gramnegativas, como *Escherichia coli*, la mayor parte de la pared celular está representada por la membrana externa. Esta capa es, de hecho una segunda bicapa lipídica, pero a diferencia de la membrana citoplasmática, no está compuesta solo por fosfolípidos y proteínas, sino que también contiene polisacáridos. Los lípidos y los polisacáridos están unidos en la membrana externa y se presentan formando un complejo, por cuyo motivo esta membrana se denomina capa de lipopolisacárido o simplemente LPS.¹⁴

1.2.1.2 Composición química del LPS

Se conoce la composición del LPS de varias bacterias. La porción polisacáridica del LPS consta de dos porciones: el núcleo del polisacárido y el polisacárido O. (Fig. 1)

El polisacárido O está unido al núcleo y consta generalmente de galactosa, glucosa, ramnosa y manosa (hexosas), así como uno o más dideoxiazucres poco frecuentes como abecucosa, colitosa, paratosa o tivelosa. Estos azúcares se unen formando entre sí secuencias de cuatro o cinco unidades que a menudo están ramificadas. La repetición de esta secuencia de azúcares da lugar a la formación de un largo polisacárido O.¹⁴

La porción lipídica del LPS, conocida como lípido A, no es un lípido derivado del glicerol sino que los ácidos grasos se unen por un enlace éster con los grupos amino de un disacárido compuesto por N-acetilglucosamina-fosfato, el disacárido se une al núcleo del polisacárido a través de KDO (cetodesoxioctanato). Los ácidos grasos que se encuentran normalmente en el lípido A son el ácido caproico (C6), laurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16) y esteárico (C18).

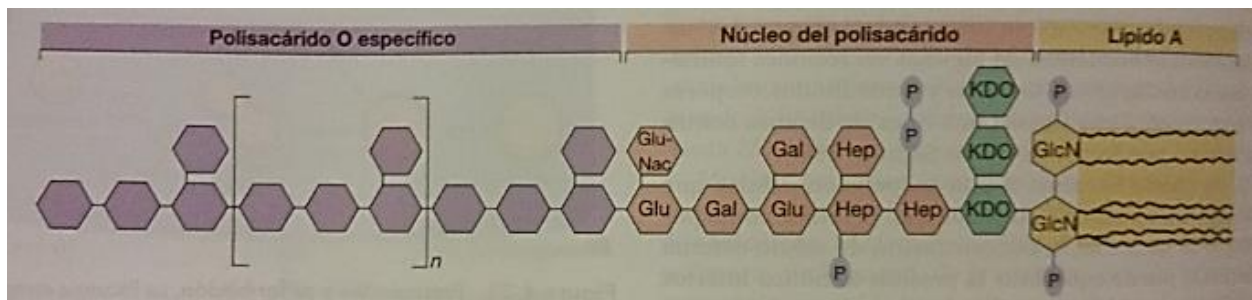


Fig.1 Estructura del lipopolisacárido de Bacteria gramnegativas

El LPS reemplaza a la mayoría de los fosfolípidos en la cara externa de la membrana externa, mientras la cara interna tiene una estructura semejante a la de la membrana citoplasmática. Sin embargo, también está presente el complejo lipoproteico en la cara interna de la membrana externa. Esta lipoproteína funciona como un anclaje entre la membrana externa y el peptidoglicano. Por tanto, aunque se considera que la membrana externa es una bicapa lipídica, su estructura difiere de la de la membrana citoplasmática, especialmente en lo que se refiere a la cara externa que está en contacto con el medio.¹⁴

1.2.1.3 Toxicidad de endotoxina

Aunque la función principal de la membrana externa es estructural, una importante propiedad biológica es que resulta tóxica para los animales. Entre las bacterias gramnegativas que son patógenas para el hombre y otros mamíferos se encuentran especies de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia*, algunos de los síntomas intestinales típicos que provocan estos patógenos se deben al efecto tóxico de la membrana externa. Las propiedades tóxicas se asocian con el LPS y en particular con el lípido A, por lo cual se usa el término endotoxina para referirse a este componente tóxico. Algunas endotoxinas causan síntomas muy fuertes en el hombre que incluyen dolores gastrointestinales (gas, diarreas, vómitos). Las endotoxinas son responsables de varias enfermedades bacterianas, por ejemplo las infecciones alimenticias por *Salmonella*. Es interesante destacar que el LPS de algunas bacterias no patógenas también tiene propiedades tóxicas. Por tanto, no es necesario que el organismo sea patógeno para que su pared celular contenga elementos tóxicos.⁴

Las endotoxinas están unidas a la célula y se liberan en grandes cantidades solo cuando las células se lisan y en pequeñas cuando se da la reproducción bacteriana.

Estas endotoxinas causan una gran variedad de efectos fisiológicos, el síndrome prácticamente universal por la exposición a endotoxinas en la fiebre, puesto que las endotoxinas estimulan en las células del hospedador la liberación de proteínas llamadas pirógenas endógenas, que afectan el centro termorregulador del cerebro. Además, las endotoxinas pueden causar diarrea; una rápida disminución de linfocitos, leucocitos y plaquetas y una inflamación generalizada. Las dosis altas de endotoxinas pueden causar la muerte por choque hemorrágico y necrosis tisular.

Algunos estudios indican que el lípido A del lipopolisacárido es el responsable de su toxicidad, mientras que la función principal del polisacárido es hacer que la toxina sea hidrosoluble e inmunogénica. Sin embargo, diversos estudios realizados en animales indican que tanto el lípido como el polisacárido son necesarios para poder producir efectos tóxicos.¹⁴

1.2.1.4 Mecanismo de acción de endotoxinas

Cuando la endotoxina es liberada no ocasiona daños celulares o tisulares de manera directa, pero estimula a células competentes para actuar como mediadores químicos. Se ha demostrado que los macrófagos son el principal blanco de las endotoxinas. Después de liberarse de la pared celular bacteriana, el LPS se dirige de forma obligada a una proteína plasmática llamada proteína receptora de LPS (LBP). Y es entregada a CD14, un receptor celular del LPS en la superficie de los macrófagos. Posteriormente a la activación de macrófagos es el resultado de una señal provocada por un receptor de señal transductora llamada receptor de peaje (TLR). Después de una serie de interacciones, el LPS produce efectos biológicos, como la activación del factor de Hageman (factor XII de coagulación), el primer paso de sistema intrínseco de coagulación por lo que desencadena la cascada de coagulación con la producción de bradicinina. El LPS activa el factor 6 del sistema de complemento, estimulando la expresión de leucocitos, adhesión molecular sobre las células endoteliales y la estimulación de la diferenciación de osteoclastos y la resorción ósea. También puede ocasionar dolor por la interferencia de neuropeptidos y neurotransmisores.¹⁴

1.2.1.5 Bacterias Gramnegativas en el conducto radicular

A través de diversos estudios se ha demostrado que las bacterias son agentes etiológicos tanto de la infección del tejido pulpar y el desarrollo de lesiones en el tejido periapical.¹⁵ La caries dental es el principal portal de entrada de microorganismos hacia la cavidad pulpar, además los microorganismos pueden introducirse hacia la cavidad pulpar de forma mecánica o por la exposición traumática, exposición no cariosa de los túbulos dentinarios. Cuando la pulpa se necrosa, los túbulos dentinarios se convierten en tractos muertos los cuales pueden ser atravesados de forma impune por las bacterias. También los microorganismos pueden ingresar por medio de fisuras

expuestas en el esmalte, dentina y la exposición periodontal de túbulos dentinarios y canales accesorios.¹⁶

En el conducto radicular con pulpa necrótica existe un hábitat selectivo que permite que algunas especies de bacterias crezcan en preferencias de otras. Los nutrientes suministrados por los productos de descomposición de una pulpa necrótica, fluido tisular y suero de tejidos circundantes con una baja tensión de oxígeno, y productos bacterianos permiten el crecimiento selectivo de microorganismos. Por lo general, las especies más frecuentemente encontradas en las infecciones endodónticas primarias son de los géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Peptoestreptococcus*, *Eubacterium*, *Actinomyces* y *Streptococcus*.¹⁷

Las endotoxinas son potentes agentes biológicos que son capaces de inducir varias respuestas inmunológicas. Ente estas se incluyen la pirogenosidad, reacciones inflamatorias de piel, efectos vasculares y hemodinámicos, inmunotolerancia. Décadas atrás se ha demostrado la presencia de grandes concentraciones de endotoxinas en pulpas necróticas en comparación con pulpas vitales. También se ha encontrado la relación de la presencia de endotoxinas entre dientes con sintomatología en comparación con dientes asintomáticos.¹⁸

La infección del tejido pulpar, normalmente progresa hacia una periodontitis apical y en la mayoría de los casos ocasionada por una combinación de bacterias. Diversos estudios han demostrado la relación entre infecciones polimicrobianas del conducto radicular, especialmente especies gramnegativas anaerobias con signos y síntomas clínicos como el dolor espontáneo, molestia a la percusión, dolor a la palpación, inflamación y exudado purulento. Por lo que se ha encontrado asociación positiva entre altas concentraciones de endotoxinas, sintomatología y signos de infección endodóntica.¹⁸

Schein y Schilder reportaron que en conductos radiculares severamente infectados una presencia de 1µg de endotoxina.¹⁸ Otros estudios han reportado la presencia de endotoxinas en conductos con infección endodóntica primaria con valores medio de 152.46 EU/ml hasta 272 EU/ml.²

Estudios han mencionado que el LPS puede tener difusión a través de los túbulos dentinarios en periodos de exposición relativamente cortos (24 hrs), el LPS puede transmitirse a través de la pared de la dentina pudiendo al cemento.^{19,20}

Ya se han realizado estudios encontrando que se puede tener una difusión LPS de 0.5 mms de dentina en dirección apical en un periodo de 15 minutos a 4 horas.²¹

1.2.1.6 Influencia de endotoxina sobre osteoclastogénesis

Se ha postulado la acción destructiva de las endotoxinas, la cual es mediada por la activación del sistema de complemento. Subsecuentemente la interferencia en C5, la cual es una sustancia que induce a la permeabilidad vascular, causa vasodilatación, atracción quimiotaxica de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Se ha encontrado que las endotoxinas estimulan la resorción ósea en cultivos de tejidos y posee la capacidad de atracción de osteoclastos hacia el hueso.¹⁸

El LPS tiene un papel importante sobre la estimulación de la síntesis y liberación de las principales citoquinas con actividad osteoclástica conocidos como interleucinas I y Factor de Necrosis Tumoral Alpha de las células del sistema inmune. El LPS estimula a las células del huésped a liberar prostaglandinas E, un eicosanoide que ha demostrado su influencia como mediador en la resorción de ósea.²²

1.2.1.7 Inactivación de endotoxinas en el tratamiento endodóntico

En el tratamiento endodóntico la presencia del LPS tiene un papel fundamental como origen y persistencia de lesiones periapicales. (Fig. 2) Diversos medicamentos han sido estudiados para observar la desactivación de la endotoxina pero solamente la medicación intraconducto con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ha podido inactivarla.²⁴



Fig. 2 Órgano dental con presencia de Lesión Periapical

Durante la terapia endodóntica, microorganismos gramnegativos viables pueden persistir al sellar los conductos radiculares. Y a pesar de que las bacterias gramnegativas que se encuentran presentes en el conducto radicular lleguen a morir, el LPS de la pared celular puede liberarse y ocasionar una respuesta de los tejidos periapicales. De igual manera, si las bacterias gramnegativas son expulsadas hacia los tejidos periapicales durante el proceso de la instrumentación del conducto radicular puede haber una respuesta de los tejidos periapicales, pudiendo presentarse signos y síntomas de inflamación clínica.¹⁸

Debido a sus propiedades el Hipoclorito de Sodio es el irrigante más utilizado en el tratamiento de conductos radiculares. En diversos estudios clínicos se ha evaluado su efectividad en la eliminación o inactivación de endotoxinas. Los resultados de estos estudios han arrojado que el empleo Hipoclorito de Sodio en la preparación biomecánica del sistema de conductos radiculares de dientes con necrosis pulpar

disminuye los niveles de endotoxinas pero no es capaz de eliminar la presencia de estas en el conducto radicular.

La combinación de diversos agentes irrigantes como EDTA, NaOCl, Clorhexidina, cloruro de Clorhexidina, etanol en estudios In vitro han demostrado poca o ninguna capacidad de afectar a el LPS.^{2,5,25.}

En el tratamiento de dientes con infección endodóntica primaria, los microorganismos y endotoxinas pueden quedar remanentes en el sistema de conductos radiculares, túbulos dentinales y en cráteres apicales, por lo cual se ha sugerido la necesidad de colocar un medicamento intraconducto, para la eliminación de estas.²⁵

También se ha demostrado que después de la instrumentación del conducto radicular si no es colocado un curativo de demora, cualquier microorganismo remanente en el conducto radicular puede proliferar en el periodo entre citas.²³

1.2.1.8 Inactivación de endotoxinas a través de medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio

Las primeras referencias sobre la introducción del Hidróxido de Calcio en odontología se da en 1838. Sin embargo, su uso clínico progreso en 1920 se introdujo la utilización del Hidróxido de Calcio en Endodoncia, se caracteriza por tener un pH altamente alcalino por lo que tiene una amplia aplicación clínica. Su uso está indicado en casos de protección pulpar directa, pulpotomías en dientes permanentes con ápice incompleto, resorciones y perforaciones dentales, cemento sellador de conductos radiculares y como medicamento intraconducto entre citas.²⁴

Su amplio uso es debido a las propiedades que se le han atribuido como:

Actividad antibacteriana

Biocompatibilidad

Propiedad Higroscópica

Capacidad de reducir el exudado periapical

Capacidad de inducir a la mineralización

Disolver tejido necrótico

Estimula la reparación de tejidos apicales y periapicales con lesiones crónicas.

A través de muchos estudios de control In vivo e In vitro se ha demostrado que con el empleo del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se puede lograr la reducción de la población microbiana presente en conductos radiculares, también se ha observado el efecto de inhibición de la proliferación bacteriana a corto y largo plazo.²⁷

El Hidróxido de Calcio actúa alterando la pared celular bacteriana y desnaturaliza endotoxinas. Este efecto es muy deseable, puesto que el material de la pared celular muerta permanece después de destruir las bacterias causantes de la infección del conducto radicular. El $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no solo destruye las bacterias sino que también reduce el efecto del lipopolisacárido contenido en el material sobrante de la pared celular.^{23,28,29}

Safavi y Nichols en sus estudios han concluido que el Hidróxido de Calcio hidroliza la fracción del lípido A, la cual una molécula altamente tóxica, responsable de los efectos dañinos de la endotoxina.^{23,30}

Se llegó a la conclusión de que el Hidróxido de calcio transforma el lípido A en ácidos grasos y amino azúcares que son componentes atóxicos. Estos resultados fueron confirmados en estudios posteriores donde se observó que el hidróxido de calcio desintoxica LPS bacteriano en estudios in vitro.^{23,29.}

También se ha observado que el Hidróxido de Calcio transforma al lípido A en ácidos grasos y amino azúcares los cuales son componentes atóxicos.²⁹

En estudios In vivo, se ha evaluado radiográficamente el efecto de endotoxinas más Hidróxido de Calcio sobre tejidos apicales y periapicales de perros, donde se ha observado que la endotoxina da origen a la formación de lesiones periapicales

después de 30 días. A través de estos estudios el Hidróxido de Calcio ha demostrado ser capaz inactivar el LPS.²⁴

La preparación biomecánica aunada con el uso de diferentes soluciones irrigantes y la colocación de Hidróxido de Calcio como medicamento intraconducto en dientes de perro ha demostrado ser eficaz en la inactivación de endotoxinas en comparación de la preparación biomecánica sin colocación de medicamento intraconducto.⁴

El Ca(OH)_2 no se puede clasificar como un antiséptico convencional, pero destruye las bacterias presentes en el conducto radicular, el efecto antiséptico del Hidróxido de Calcio es lento. Los experimentos de contacto directo in vitro requieren 24 horas para producir la muerte completa de los enterococos.³¹

En experiencias clínicas se ha demostrado la necesidad de dejar colocado el preparado durante una semana para desinfectar con mayor seguridad los conductos radiculares.³²

Además el efecto directo del LPS en el proceso de osteoclastogénesis se ha visto reducido debido a la inhibición que produce el Hidróxido de Calcio en la estimulación de formación de osteoclastos. Se iba informado que el hidróxido de calcio ha reducido la diferenciación de osteoclastos.³³

1.2.2. Irrigación del conducto radicular

La irrigación del sistema de conductos, se define como el lavado y aspiración de todos los restos y sustancias que puedan estar contenidos en la cámara pulpar o conductos radiculares esto se logra utilizando soluciones antisépticas.³⁴ Uno de los más importantes requisitos de un irrigante ideal es la habilidad para eliminar microorganismos del sistema de conductos radiculares. Este efecto antimicrobiano puede ser un efecto químico directa o indirectamente por facilitar la desinfección mecánica a través de la lubricación, disolución de tejido y el lavado de los restos contaminados que se acumulan durante la preparación del conducto radicular. Además los irrigantes del conducto radicular deben ser biocompatibles con los tejidos de la cavidad oral.

Un gran número de sustancias han sido empleadas como irrigantes del conducto radicular, incluyendo ácidos (ácido cítrico y fosfórico), agentes quelantes (EDTA), enzimas proteolíticas, soluciones alcalinas (Hipoclorito de Sodio, Hidróxido de Sodio, urea Hidróxido de potasio), agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno y Gly-oxide), soluciones anestésicas locales y solución salina.³⁵

La preparación biomecánica con solo agentes irrigantes no inactiva a las endotoxinas, sin embargo el mismo tratamiento asociado con la colocación de medicación intraconducto es efectiva en la inactivación de los efectos tóxicos de las endotoxinas.⁴

1.2.2.1 Hipoclorito de Sodio (NaOCl)

La Asociación Americana de endodoncia, ha definido el Hipoclorito de sodio como un líquido claro, pálido, verde-amarillento, extremadamente alcalino y con fuerte olor clorino, que presenta acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos y además potente agente antimicrobiano. Actualmente el Hipoclorito de Sodio (NaOCl) es el agente irrigante más popular. Debido a que es un agente antimicrobiano de amplio espectro que ha demostrado ser efectivo en contra de bacterias, bacteriófagos, esporas, hongos y virus. La eficacia antimicrobiana del Hipoclorito de Sodio, se debe a la capacidad de oxidar e hidrolizar las proteínas celulares y por lo tanto ocurren cambios osmóticos en las que afectan los fluidos expulsándolos de la célula debido a una hipertonicidad. El Hipoclorito de Sodio tiene un pH aproximado de 11 – 12, y cuando entra en contacto con proteínas tisulares se forma nitrógeno, formaldehído y acetaldehído, a corto tiempo los enlaces peptídicos son rotos, resultando en la disolución de proteínas. Durante el proceso el hidrogeno dentro de los grupos amino son reemplazados por clorina, por lo cual se forman cloraminas, lo cual juega un importante papel en la efectividad antimicrobiana del Hipoclorito de Sodio. Como consecuencia de esto, el Hipoclorito de Sodio es altamente tóxico en tejidos vitales a altas concentraciones. A concentraciones bajas, el Hipoclorito induce a una reacción inflamatoria cuando está en contacto con tejidos vitales.³⁵

1.2.2.2 Ácido Hipocloroso (HOCl)

La solución de Ácido Hipocloroso es producida por cargas electroquímicas a una solución salina de baja concentración a través de un generador (Fig.3).¹¹ El Ácido Hipocloroso (HOCl) tiene un tamaño molecular pequeño que permite la penetración de los componentes de la membrana celular, esto influye en la permeabilidad de la pared y ocasiona la ruptura de la membrana celular. Además se ha presencia del HOCl dentro de los fagocitos.³⁶



Fig. 3 Generador Optident –Puricore, empleado en el uso de soluciones electroquímicamente activadas

1.2.2.3 Mecanismos de acción del Ácido Hipocloroso.

Como desinfectante el Ácido Hipocloroso penetra fácilmente en la célula bacteriana a través de la membrana citoplasmática, actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos; oxida grupos sulfhídricos (-SH) y ataca grupos aminos, indoles y al hidroxifenol de la tirosina.³⁷

1.2.2.4 Aplicaciones del Ácido Hipocloroso

El Ácido Hipocloroso (HOCl) ha sido ampliamente usado para la desinfección de superficies, para la desinfección de endoscopios, y para la aplicación de medidas de seguridad sanitaria en la industria alimenticia. Además se ha utilizado como desinfectante en instituciones médicas, para mejorar las medidas de asepsia u antisepsia dentro de estas.^{35, 36} Existen diferentes soluciones en el mercado en donde la solución Aquatine Endodontic Cleanser fue la primera solución de Ácido Hipocloroso aprobada por la FDA como un agente irrigante alternativo al uso de Hipoclorito de Sodio en Endodoncia.¹¹

1.2.2.5 Biocompatibilidad del Ácido Hipocloroso

El Ácido Hipocloroso no posee toxicidad celular cuando se aplica en dosis clínicamente efectivas. Se ha reportado extensamente que el cuerpo humano regula los niveles de Ácido Hipocloroso (HOCl) durante la respuesta inflamatoria empleando su propio sistema de “defensa antioxidante”, a través de moléculas como taurina y nitritos, los cuales neutralizan al HOCl y protegen a las células contra el posible daño oxidativo. En el tratamiento de heridas se ha empleado soluciones de Ácido Hipocloroso como por ejemplo en las heridas crónicas de pacientes con úlceras venosas. El Ácido Hipocloroso ofrece un desbridamiento selectivo y al parecer reduce la cantidad de exudado en las heridas de tejidos blandos. Aunque, el mecanismo exacto de estas observaciones no se conoce. El HOCl ha mostrado propiedades fibrinolíticas cuando se utiliza clínicamente, y una reducción del exudado se correlaciona con la disminución en la carga bacteriana.³⁶

1.2.3 Prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus para detectar endotoxinas

Dado que las endotoxinas son pirógenos, determinados fármacos como los antibióticos o las soluciones intravenosas no deben contener endotoxinas. Se ha desarrollado una prueba para la detección de endotoxinas con sensibilidad muy alta, que consiste en utilizar amebocitos del cangrejo herradura *Limulus polyphemus* (Fig. 4). La endotoxina provoca la lisis específica de los amebocitos de este animal. En la prueba estándar del lisado de

amebocitos del Limulus (LAL), se mezclan extractos de amebocitos del Limulus con la solución que se va a ensayar: si la toxina está presente, el extracto de amebocitos gelifica y precipita, causando un cambio perceptible en la turbidez. Esta reacción puede cuantificarse con un espectrofotómetro, que es capaz de detectar cantidades ínfimas como 10 pg/ml de lipopolisacarido.³⁸



Fig. 4 Extracción de amebocitos a partir del cangrejo *Limulus polyphemus*.

Existen tres variantes de esta prueba

Prueba cromogénica

Prueba Turbidimétrica

Prueba Gel-Clot

Las pruebas del Limulus se utilizan para detectar endotoxinas de muestras clínicas de suero o líquido cefalorraquídeo, entre otras. Un resultado positivo supone una presunta evidencia de infección por bacterias gramnegativas. El agua para beber, y el agua que se emplea en los fármacos y soluciones inyectables también se someten de forma

rutinaria a la prueba del Limulus para detectar y eliminar potenciales fuentes de contaminación por patógenos gramnegativos.¹⁴

1.2.3.1 Pyrosate®: Prueba rápida de detección de endotoxinas

El kit Pyrosate® se ha desarrollado como una herramienta fácil de usar para la prueba LAL gel-coágulo. El ensayo no requiere entrenamiento especial o suministros de laboratorio. Siguiendo paso a paso las instrucciones que vienen ilustradas permitir al usuario realizar ensayos en cuestión de minutos. El kit de Pyrosate® proporciona resultados rápidos y es especialmente útil para la investigación, en la examinación de agua y líquido de diálisis (Fig. 5)³⁸



Fig.5 Prueba de rápida de detección de endotoxinas Pyrosate®

1.2.3.2 Sensibilidad

El kit Pyrosate® está disponible en dos sensibilidades: 0,25 EU / mL y 1,0 EU / mL. Estas sensibilidades se pueden lograr en menos de 30 minutos.

1.2.3.3 Realización de la prueba

El kit Pyrosate® es la única prueba rápida gelificación-coagulación, que contiene tubo de endotoxina (PPC) que contiene un 2λ † ligado a la tubo de muestra (SPL) para cada prueba de sensibilidad. Esta característica es única para la prueba Pyrosate®. El tubo de endotoxina (PPC) asegura que la muestra no interfiere con la prueba, descartando falsa negativos (Fig.6). Pyrosate® está formulado para eliminar falsos positivos debido a (1G3)-β-D-glucanos.³⁸

1.2.3.4 Reconstitución

Pyrosate® se reconstituye directamente con la muestra mediante la adición de 0,5 ml al de muestras de tubo (SPL). Después de aproximadamente 60 segundos de suave mezcla de 0,25, ml se transfiere al tubo de endotoxina (PPC). La incubación de lote específico el tiempo a 37 ± 1 ° C se da en el Certificado de Cumplimiento.³⁸



Fig. 6 Tubos de Pyrosate® para estudio de la muestra (SPL) y prueba de Control Positivo del Producto (PPC) .

1.2.3.5 Estabilidad

Pyrosate® es estable a temperatura ambiente y no requieren refrigeración para el transporte o el almacenamiento.

1.2.3.6 Aplicaciones del producto

- Hemodiálisis
- Análisis de agua y de los sistemas de agua
- Filtros industriales
- Investigación de productos

1.2.3.7 Beneficios del producto

- Menor tiempo de ensayo
- Especificidad en endotoxinas
- No se requieren de diluciones
- No requiere refrigeración

El kit Pyrosate® está disponible en un kit de 10 pruebas y un paquete de 25 pruebas a granel para cada sensibilidad. Cada kit contiene tubos de muestra de prueba (SPL) y endotoxinas tubos de ensayo (control positivo del producto-PPC).³⁵

2 Justificación

El objetivo biológico del tratamiento de conductos radiculares consiste en eliminar todo el tejido pulpar, microorganismos y endotoxinas, que se encuentren presentes en el conducto radicular.

Actualmente se ha incrementado en la clínica endodóntica la realización del tratamiento de conductos radiculares con necrosis pulpar en una sola sesión, sin la colocación de un medicamento intraconducto. A través de nuevos instrumentos rotatorios para mejorar la conformación del conducto radicular, y sobre todo con el uso de diversos protocolos de irrigación se ha buscado nuevas y mejores alternativas para la desinfección del conducto radicular de una manera más rápida y segura. Pero no se debe pasar por alto el hecho de que durante el tratamiento de conductos de pulpa necrótica el objetivo no es solamente el eliminar el tejido necrótico y bacterias presentes, sino también eliminar los productos y subproductos de estas bacterias. Al no llevarse a cabo la desinfección del sistema de conductos se puede ocasionar que exista contaminación de los túbulos dentinarios, la persistencia de lesiones periapicales han llevado en muchas ocasiones al fracaso del tratamiento de conductos inicial, generando la necesidad de realizar un retratamiento endodóntico o llevar a cabo procedimientos quirúrgicos. En caso específico del LPS, a través de diversos estudios se ha demostrado la relación entre la presencia de lesiones periapicales y la presencia de signos y síntomas patológicos. Además de que múltiples investigaciones demuestran la incapacidad de los agentes irrigantes para inactivarlo de manera satisfactoria. Por lo cual el presente estudio pretende analizar el efecto del agente irrigante más popular en endodoncia como lo es el Hipoclorito de Sodio en una concentración del 6%, con la intención de obtener al máximo propiedades antimicrobianas y de inactivación de endotoxinas y de una nueva solución electroquímicamente activada a base de Ácido Hipocloroso, el cual se ha introducido en el área de la endodoncia atribuyendo propiedades antimicrobianas, de disolución

de tejido, de limpieza sin incluir la toxicidad a los tejidos y por ultimo comparar la utilización de un agente irrigante como el Hipoclorito de Sodio al 6 % más la asociación de la medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio, con la finalidad de encontrar nuevas formas de optimizar el tratamiento endodóntico.

3 Planteamiento del Problema

La presencia de endotoxinas en el órgano dentario con tratamiento de conductos radiculares está relacionado con fracasos de tratamientos de conductos radiculares y a la persistencia de lesiones periapicales. En el campo de la Endodoncia, se continúa con la búsqueda lograr la desinfección del sistema de conductos radiculares por medio agentes irrigantes que muestren mejores propiedades antimicrobianas, como por ejemplo el Hipoclorito de Sodio. Sin embargo, el riesgo de toxicidad en los tejidos al emplearlo en la terapéutica endodóntica es siempre latente al realizar el tratamiento de conductos radiculares. En este punto es donde resalta la introducción de un nuevo agente irrigante que posea efectividad antimicrobiana como la hace el Hipoclorito de Sodio y presente mayor seguridad en cuanto uso como lo es el empleo del Ácido Hipocloroso.

El empleo de la medicación intraconducto por otra parte ha demostrado su efectividad antimicrobiana con el inconveniente de aumentar las sesiones del tratamiento endodóntico, aplazando por un tiempo el finalizar el tratamiento de conductos radiculares, lo que en algunas ocasiones puede llevar a contratiempos y complicaciones entre sesiones.

En la práctica de la Endodoncia surgen las siguientes preguntas:

¿Es posible desinfectar por completo la anatomía en ocasiones tan compleja del sistema de conductos radicular?, ¿Es posible eliminar a todas las bacterias presentes y sus endotoxinas con solamente irrigar con Hipoclorito de sodio o se requiere dejar medicado el conducto radicular?

¿Pueden el empleo por si solos de Hipoclorito de Sodio al 6% o del Ácido Hipocloroso inactivar la endotoxina de igual manera que la asociación de irrigación y la medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio?

4. Hipótesis

Hipótesis nula: No existe diferencia estadísticamente significativa en el efecto de inactivación de endotoxinas de *E. coli* con empleado NaOCl al 6%, y empleando un agente irrigante asociado con la medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio.

Hipótesis alternativa: Si existe diferencia estadísticamente significativa en el efecto de inactivación de endotoxinas de *E. coli* con NaOCl al 6%, y empleando un agente irrigante asociado con la medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio.

5 Objetivo

Evaluar la inactivación de endotoxinas (LPS) empleando Hipoclorito de Sodio al 6%, Ácido Hipocloroso y la asociación de irrigación con Hipoclorito de Sodio y la medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio.

6 Variables

6.1 Dependientes

Presencia de endotoxina (LPS) de E. coli

6.2 Independientes

Solución de Hipoclorito de Sodio al 6%

Solución de Ácido Hipocloroso (Sterilox)

Solución de Hipoclorito de Sodio asociado a la colocación de medicación intraconducto a base Pasta de Hidróxido de Calcio.

6.3 Operación de variables

Variable Dependiente	Descripción	Medición
Presencia LPS de Escherichia coli	Se le define como la presencia de endotoxinas (LPS) de E coli, presentes en agua en contacto con los discos de dentina de bovino, después de ser sometido a los diversos agentes irrigantes y analizado por medio de la prueba de detección de endotoxinas Pyrosate®	<p>Positiva</p> <p>La muestra contiene valores > 0.25 EU/ml de endotoxinas</p> <p>Se observará la formación de un coágulo</p> <p>Negativa</p> <p>La muestra contiene valores < 0.25 EU/ml de endotoxinas</p> <p>Se observará con la ausencia de formación de un coágulo.</p>

7 Materiales y métodos

7.1 Tipo de Estudio

Estudio experimental, comparativo, observacional, In Vitro

7.2 Universo de Estudio

100 Discos de dentina de órganos dentarios de bovino

Muestra

3 grupos de 30 discos de dentina

7.3 Criterios

7.3.1 Inclusión

Órganos dentarios unirradiculares

Órganos dentarios sin presencia de caries

Órganos dentarios con raíces completas

7.3.2 Exclusión

Discos de dentina con fracturas o no estandarizados

7.4 Materiales

Órganos dentarios de bovino

Disco de diamante

Regla milimétrica (Miltex)

Pieza de baja velocidad (Dentamerica)

Gasas estériles

Bolsas de esterilizar

Horno seco

Gradillas

EDTA 17 %

Jeringas hipodérmicas

Pipetas libres de pirógenos (Pyrosate pipettes)

Endotoxina (LPS) de Escherichia coli (E. coli H0113: H10) (Control Standard Endotoxin)

Kits de test Pyrosate® LAL

Lima # 15 tipo K (Maillefer)

Pipetas libres de pirógenos

Tubos de borosilicato estériles (Pyrotube®)

LAL Reagente

Agua estéril libre de pirógenos. (PISA)

Hipoclorito de Sodio al 6% (Clorox)

Generador Optident Puricore

Ácido Hipocloroso (Sterilox electrolyte Solution, Sterilox, Puricore)

Reloj cronometro

Cámara fotográfica (Sony)

Parafilm

Micropipeta

Vacuum de laboratorio

Pasta de Hidróxido de Calcio Ultracal XS (Ultradent)

Filtro estéril milipore

Guantes estériles

Pinzas de curación

Mechero de gas

Estufa de incubación

Termómetro

7.5 Metodología

Los órganos dentarios de ganado bovino se limpiaron y después se desinfectaron en un recipiente con Hipoclorito de Sodio al 1% por un periodo de 24 horas. A los órganos dentarios de bovino se les retiró la corona con lima tipo # 15 tipo K (Maillefer) se retiró la presencia de restos de tejido pulpar. Se seccionó 3mms de la porción apical. El resto de la raíz fue seccionada en discos de dentina cilíndricos de 5 mms de altura empleando disco de diamante en pieza de baja velocidad (Fig.7).

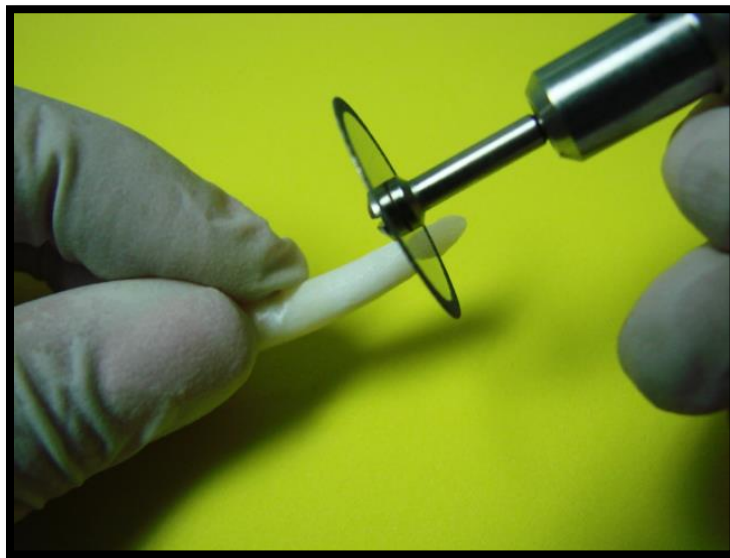


Fig. 7 Corte de discos de dentina de bovino.

El lumen de los discos de dentina fue estandarizado con la utilización de una fresa de bola (2.5mm)

El lodo dentinario fue removido de los discos de dentina sumergiendo las muestras en una solución de EDTA por 4 minutos y después se enjuagaron con agua libre de pirógenos y se secaron empleando gasas estériles. .

Los discos de dentina se colocaron en un matraz de vidrio, sellado con algodón y fueron colocados en el horno seco, en donde se dejaron durante un periodo de siete horas a 180 ° C para poder lograr una completa esterilización y despirogenización de las muestras (Fig. 8).



Fig. 8 discos de dentina de bovino después del proceso de despirogenización.

Se tomaron con 5 discos de dentina al azar del matraz, se colocaron en recipientes de forma individual que contenían 1 ml de agua libre de pirógenos agitándolos suavemente. Se les colocó en la incubadora por un periodo de 24 horas. Con la ayuda de una pipeta se tomó una muestra de 0.5 ml de cada tubo del líquido en donde se incubaron los discos de dentina y se les realizó una prueba empleando el test de detección de endotoxina Pyrosate ®, con lo cual se pudo poder determinar la

despirogenización de los discos de dentina de bovino para poder realizar este estudio.

Los discos de dentina de bovino fueron divididos en los siguientes grupos:

Grupo A: 30 discos de dentina tratados con Hipoclorito de Sodio al 6%

Grupo B: 30 discos de dentina tratados con Ácido Hipocloroso.

Grupo C: 30 discos de dentina tratados con Hipoclorito de sodio 6% y en donde se colocó pasta de Hidróxido de Calcio como medicación intraconducto por siete días.

Todos los discos de dentina fueron colocados en una solución LPS de E. coli colocados en recipientes individuales y se incubaron por 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los discos de dentina del grupo A fueron colocados en tubos de borosilicato libres de pirógenos Pyrotube® con 2 ml de Hipoclorito de Sodio al 6% por un tiempo de 40 minutos. Se les agitó suavemente en periodos de cada 10 minutos (Fig. 9).

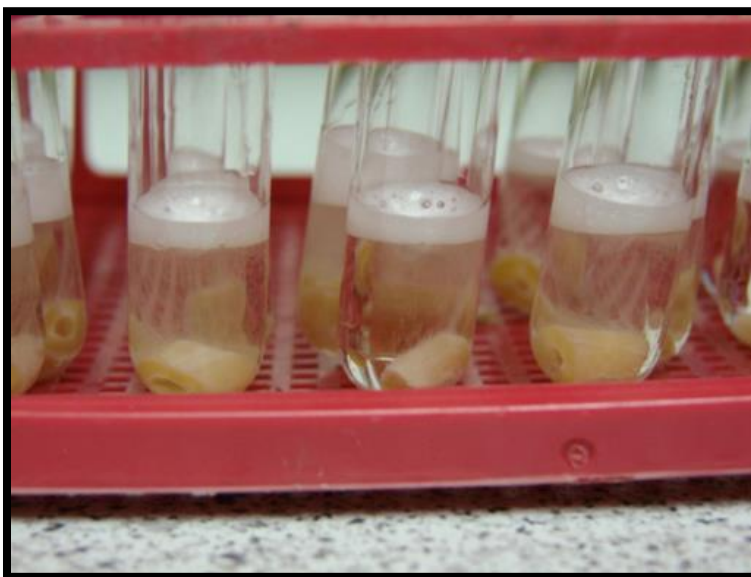


Fig. 9 Discos de dentina de bovino tratados con 2 ml de NaOCl al 6%

Los discos de dentina del grupo B fueron colocados en tubos de borosilicato libres de pirógenos Pyrotube con 2 ml de solución de Ácido Hipocloroso (previamente activada

en generador) por un tiempo 40 minutos. Se les agitó suavemente en periodos de cada 10 minutos (Fig. 10).



Fig. 10 Generados Optident y Solución de Ácido Hipocloroso (Sterilox)

Los discos de dentina del grupo C fueron colocados en tubos Pyrotube durante 40 minutos para sumergirlos en 1 ml de Hipoclorito de Sodio al 6%, posteriormente fueron lavados con agua estéril y se les colocó en el centro del disco de dentina una pasta de Hidróxido de Calcio (Ultracal XS, ultradent) (Fig. 11). Después fueron colocados tubos Pyrotube que fueron sellados con parafilm. Se procedió a incubarlos en el horno a una temperatura de 37°C por 7 días.

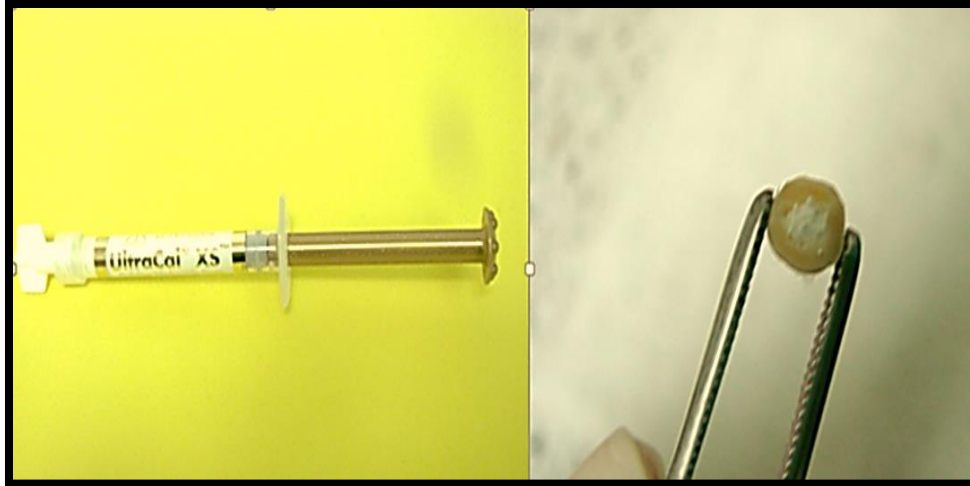


Fig. 11 Hidróxido de Calcio Ultracal XS (Ultradent), colocada en discos de dentina de bovino

En el grupo A y B después de transcurridos los 40 minutos de exposición al agente irrigante los discos de dentina, se le realizó un enjuague con agua libre de pirógenos, colocados en un filtro estéril buscando inactivar y eliminar restos del agente irrigante con el que fueron tratados (Fig. 12), En el grupo C medicado con Hidróxido de Calcio fue hasta haber pasados siete días.



Fig. 12 Lavado y enjuague de discos de dentina de bovino.

Los discos de dentina de cada grupo dejaron secar colocándose en gasas estériles. Posteriormente se colocaron en recipientes Pyrotube, los que contenían 1 ml de agua estéril, se procedió a sellarlos empleando parafilm se les agitó suavemente por 20 segundos y fueron colocados en el horno para incubación por 24 horas a 37°C (Fig. 13).



Fig. 13 Tubo de borosilicato Pyrotube sellado con Parafilm.

Pasado el tiempo de incubación de las muestras de los grupos A,B y C, se tomó 0.5ml de la solución acuosa con la que tuvo contacto el disco de dentina, esto con la ayuda de una pipeta libre de pirógenos y las muestras de agua fueron sometidas a la prueba de detección de endotoxinas de Pyrosate® (Fig.14), para verificar la presencia de endotoxinas en los discos de dentina. Siguiendo las instrucciones del fabricante.

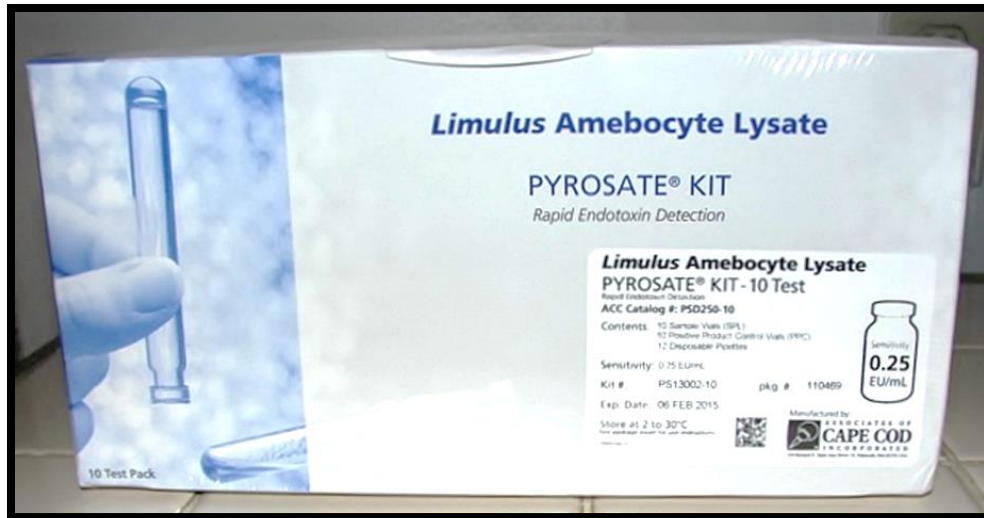


Fig. 14 Prueba Pyrosate® empleada para la detección de endotoxinas.

Pyrosate ® es un prueba rápida de detección de endotoxinas especialmente diseñado para las pruebas de agua, líquido de diálisis o de otro tipo en aplicaciones que no requieren el uso de reactivos del Lisado de amebocitos de Limulus.

Pyrosate® presenta dos tipos de tubos, en uno se coloca la muestra en estudio (SPL) y el segundo es un tubo de Control Positivo del producto (PPC). Los tubos fueron etiquetados con el grupo y con el número de la muestra. (Fig. 15). Al utilizar Pyrosate se retiró el tapón del tubo SPL (tubo de tapón azul) y PPC (tubo con tapón de color rojo), evitando tocar los bordes de los tubos para evitar el riesgo de una contaminación cruzada.



Fig. 15 Tubos para detección de endotoxinas de la prueba Pyrosate®

Con el empleo de una pipeta estéril se realizó la transferencia del tubo que contenía el líquido de la muestra de estudio, sin contaminar la punta de la pipeta, solamente tocando el extremo del bulbo de la pipeta.

Se extrajo de cada tubo en estudio (agua estéril en contacto con discos de dentina tratados) hasta 0,5 ml que se marca en la pipeta que se incluye en el kit de Pyrosate® y se le transfirió al tubo de la muestra (SPL) Pyrosate®, este contenido fue agitado suavemente para que se disolviera por completo el reactivo en un tiempo de 20 a 60 segundos.

Empleando la misma pipeta, se extrajo 0,25 ml de líquido desde el tubo de muestra Pyrosate® (SPL) y se le transfirió al Tubo de Control Positivo del Producto (PPC). Se mezcló suavemente el contenido del tubo por un periodo de 10 a 20 segundos. De forma inmediata se colocó uno a uno los tubos en estudio en gradillas, estas fueron llevadas a la incubadora, en donde permanecieron a una temperatura de 37 ± 1 ° C durante el período de tiempo de 25 minutos, como lo indica el fabricante de la prueba Pyrosate®.

Lectura de resultados

Al acabar el tiempo de incubación de los tubos de la prueba Pyrosate®, de inmediato fueron retirados de la incubadora. De manera suave se tomó uno a uno los tubos y se les dio un giro de inversión de 180 grados, con lo que se podía apreciar la ausencia o presencia de coágulo sólido de gel y poder determinar la presencia o ausencia de endotoxinas. (Fig.16)



Fig. 16 Presencia o ausencia de coágulo en prueba Pyrosate

Para poder validar a los resultados se verificaba la lectura resultado observando el tubo de la muestra (SPL) y el tubo de Control Positivo del Producto (PPC). (Fig 17)

PPC	MUESTRA (SPL)	RESULTADO
Coágulo (+)	Coágulo (+)	Prueba Válida. La muestra contiene >0.25 EU/ml
Coágulo (+)	Coágulo (-)	Prueba Válida. La muestra contiene <0.25 EU/ml
Coágulo (-)	Coágulo (+)	Prueba No Válida. Repetir la prueba.
Coágulo (-)	Coágulo (-)	Prueba No Válida. Repetir la prueba.

En el tubo Pyrosate® de Control Positivo del Producto (PPC) se debía formar un coágulo en el caso de que no se llegaba a formar se debería repetir la prueba. La falla

de la formación de un coágulo indicaba la mala manipulación del ensayo o una muestra de solución acuosa no adecuada.

En el tubo de la muestra en estudio Pyrosate® (SPL) Si un coágulo sólido se llegó a formar el resultado se registraba como positivo (+). Lo cual indicaba la presencia de endotoxina igual o mayor a 0.25 EU/ml en la muestra (Fig 18). Si no se observó la presencia algún coágulo, es decir, la mezcla permaneció en estado líquido o se rompió el coágulo, el resultado se registraba como negativo (-), indicando que no hubo presencia de endotoxina mayor a 0.25 EU/ml en la muestra.



Fig. 18 Prueba Pyrosate® indicando presencia de endotoxinas

7.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos serán registrados en una hoja de control por cada grupo de estudio y estas serán analizadas estadísticamente utilizando la prueba estadística X^2 (Chi cuadrada) con una confianza del 95% y $p < 0.05$.

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Agente *	Presencia Endotoxina	90	98.9%	1	1.1%	91	100.0%

Agente * PresenciaLPS Crosstabulation

		Presencia Endotoxina		Total
		Negativo	Positivo	
Agente NaOCl 6%		26	4	30
	HOCl	0	30	30
	Medicación intraconducto CaOH2	30	0	30
Total		56	34	90

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	75.252 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	95.773	2	.000
Linear-by-Linear Association	1.122	1	.290
N of Valid Cases	90		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 11.33.

En el análisis estadístico que se realizó utilizando el programa SPSS 19 para Windows. Se encontró que el valor de Chi cuadrada es de 75.252 y al comparar con el de Chi cuadrada en la tablas de distribución a un nivel de confianza del 95% con un error del 5% y con g. l. de 2 nos da un valor de 5.991. Por lo tanto rechazamos la hipótesis nula, ya que si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los agentes de irrigación y la medicación intraconducto sobre la presencia o no de endotoxinas.

8 Resultados

El grupo A tratado con Hipoclorito de Sodio al 6% se observó que la presencia de endotoxina igual o menor a 0.25 EU/ml fue negativa en 26 de las muestras y positiva en 4 de ellas. (Tabla 1, Gráfica 1)

GRUPO TRATADO CON HIPOCLORITO DE SODIO AL 6%			
MUESTRA	PRESENCIA DE COAGULO TUBO CONTROL	PRESENCIA DE COAGULO TUBO MUESTRA	RESULTADO ENDOTOXINA 0.25 EU/ML
1	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
2	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
3	POSITIVA	NEGATIVA	PRESENTE
4	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
5	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
6	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
7	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
8	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
9	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
10	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
11	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
12	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
13	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
14	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
15	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
16	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
17	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
18	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
19	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE"
20	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
21	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
22	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
23	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
24	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
25	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
26	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
27	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
28	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
29	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
30	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE

Tabla 1. Resultados de grupo A tratado con Hipoclorito de Sodio al 6%

En la lectura de resultados del grupo tratado con la solución de Ácido Hipocloroso fue positiva la presencia de endotoxina en una concentración igual o mayor de 0.25 en 30 de las muestras (Tabla 2 y Gráfica 2)

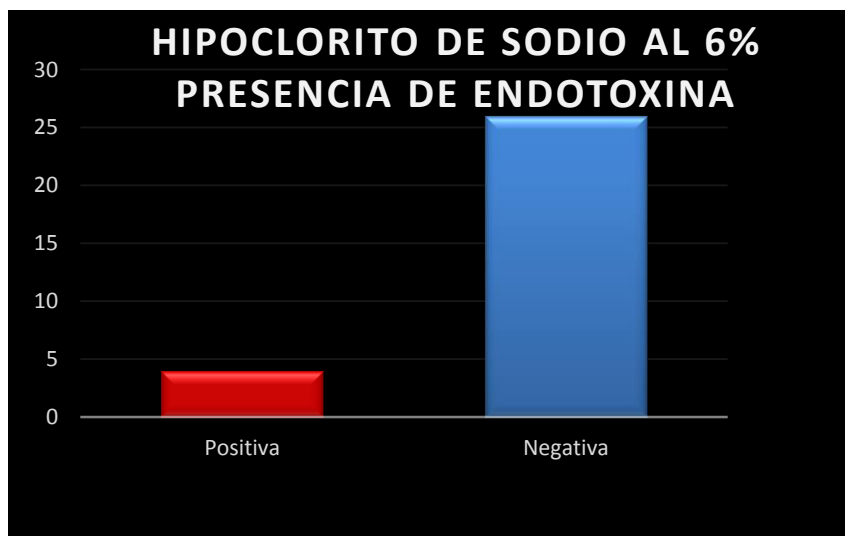
GRUPO TRATADO CON ÁCIDO HIPOCLOROSO			
MUESTRA	PRESENCIA DE COAGULO TUBO CONTROL	PRESENCIA DE COAGULO TUBO MUESTRA	RESULTADO ENDOTOXINA 0.25 EU/ML
1	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
2	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
3	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
4	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
5	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
6	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
7	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
8	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
9	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
10	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
11	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
12	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
13	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
14	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
15	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
16	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
17	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
18	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
19	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
20	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
21	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
22	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
23	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
24	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
25	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
26	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
27	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
28	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
29	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE
30	POSITIVA	POSITIVA	PRESENTE

Tabla 2. Resultados de grupo B tratado con Ácido Hipocloroso

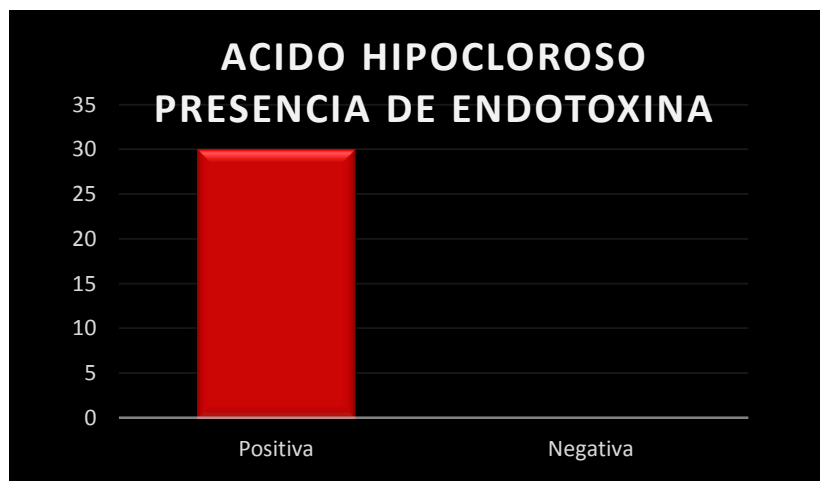
Mientras que en el grupo en el que se utilizó irrigante asociado con medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio registró 30 muestras negativas a la presencia de concentraciones igual o menores de 0.25 EU/ml. (Tabla 3 y Gráfica 3)

GRUPO TRATADO CON MEDICACIÓN INTRACONDUCTO A BASE DE HIDRÓXIDO DE CALCIO			
MUESTRA	PRESENCIA DE COAGULO TUBO CONTROL	PRESENCIA DE COAGULO TUBO MUESTRA	RESULTADO ENDOTOXINA 0.25 EU/ML
1	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
2	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
3	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
4	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
5	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
6	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
7	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
8	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
9	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
10	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
11	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
12	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
13	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
14	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
15	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
16	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
17	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
18	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
19	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
20	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
21	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
22	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
23	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
24	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
25	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
26	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
27	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
28	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
29	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE
30	POSITIVA	NEGATIVA	NO PRESENTE

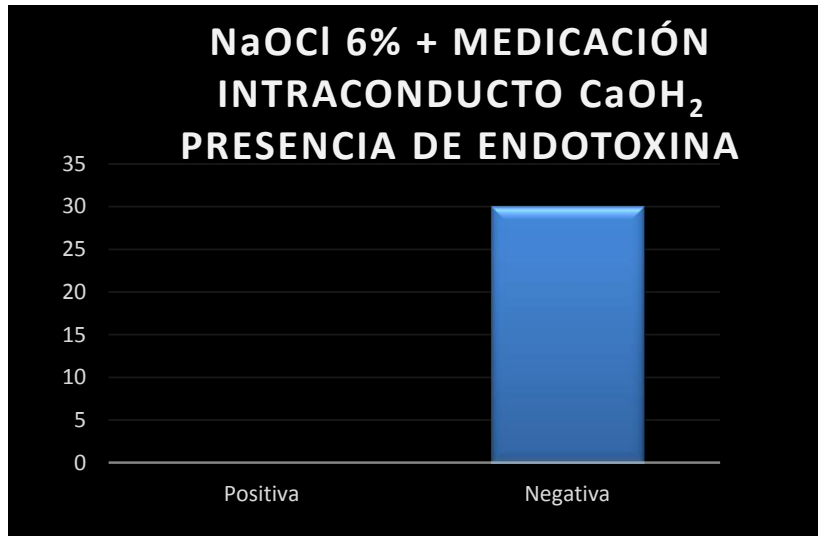
Tabla 3. Resultados de grupo C, tratado con Hipoclorito de Sodio al 6% y medicado con Hidróxido de Calcio por siete días.



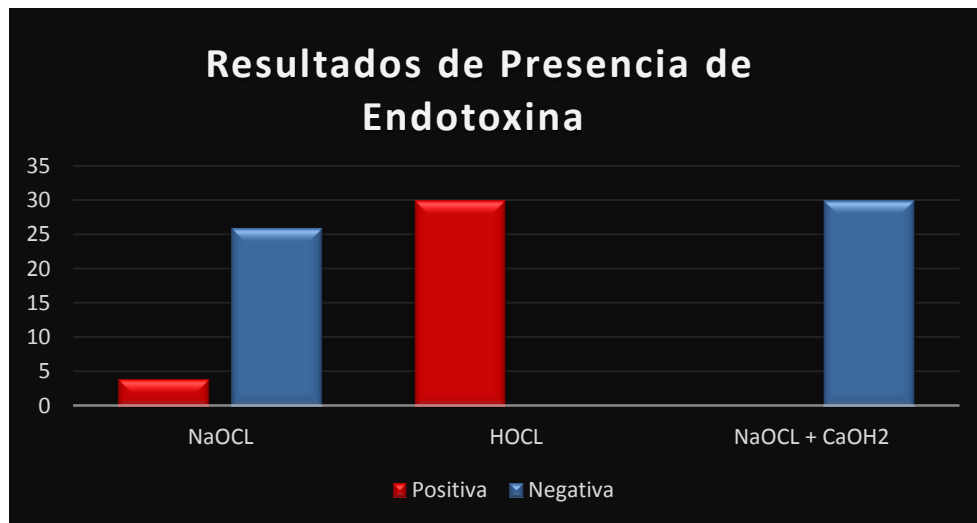
Gráfica 1. Presencia de endotoxina en Grupo tratado con Hipoclorito de Sodio al 6%



Gráfica 2. Presencia de endotoxina en Grupo tratado con Ácido Hipocloroso



Gráfica 3. Presencia de endotoxina en Grupo C, tratado con Hipoclorito de Sodio + Medicación Intraconducto a base de Hidróxido de Calcio por siete días.



Gráfica 4. Comparación de Presencia de Endotoxina entre Hipoclorito de Sodio al 6%, Ácido Hipocloroso y NaOCl combinado con medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio por siete días.

9 DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó endotoxina de E coli, el cual ha sido empleado en muchas investigaciones.^{1, 3,5} La habilidad de difusión del LPS a través de los túbulos dentinarios quedó demostrada en este estudio, ya que observamos que con periodos de exposición relativamente cortos (24 horas), el LPS puede tener difusión a través de la dentina, lo cual ha sido observado en esta investigación.¹⁹⁻²¹

Se observó la gran eficacia de la aplicación de hidróxido de Calcio como medicamento intraconducto por varios días, concordando con los hallazgos que arrojan las investigaciones realizadas por Buck, en donde el empleo de diversos agentes irrigantes y la combinación de estos no mostró una mayor inactivación al ser comparada con el uso de Hidróxido de Calcio. Se observa una eficacia del 86 % en el grupo tratado con Hipoclorito de sodio al 6%, En este caso la asociación de Hipoclorito de Sodio al 6% durante 40 minutos y la colocación de medicación intraconducto a base de Hidróxido de Calcio mostraron una eficacia del 100%, lo cual muestra como la colocación de medicación intraconducto puede inactivar de forma más efectiva al LPS.⁵

Maekaga en sus estudios reportó la eficacia del empleo de Hipoclorito de Sodio en una concentración de 2.5% en la inactivación de LPS de E. coli, en la presente investigación se encontró una eficacia mayor en el empleo del Hipoclorito de Sodio al 6%, lo que reafirma que mayor concentración posee mayor potencia. Sin embargo, los mejores resultados fueron encontrados en el grupo tratado con agente irrigante y la asociación de la medicación intraconducto con Hidróxido de Calcio.¹

En este estudio también coincidimos con los resultados obtenidos por Oliveira en donde observó que después de medicar los conductos con Hidróxido de Calcio se consiguió de un 92 a 100% de inactivación de endotoxinas, porcentaje similar al registrado en esta investigación.

Las soluciones electroquímicamente activadas, como el ácido Hipocloroso empleado en investigaciones recientes y promovido como un agente de irrigación en Endodoncia alternativo al uso del Hipoclorito de Sodio, ha mostrado resultados favorables en cuanto actividad antimicrobiana y remoción de lodo dentinario, disolución de tejido, compatibilidad. Sobre la necesidad activación del Ácido Hipocloroso es de resaltar que es una desventaja ya que el agente se encuentra en estado inactivo y no puede ser utilizado hasta después de ser activado electroquímicamente a través de un generador, factor que dificulta su uso al ser comparado con otros agentes irrigantes usados en Endodoncia.^{6,8-13}

En cuanto a la inactivación de endotoxinas en este estudio fue nula su eficacia, ya que en ninguna de los ejemplares tratados se pudo observar ausencia de LPS. Es de suma importancia la realización de mayor número de investigaciones ya que es los resultados observados no concuerda con la información obtenida en otras investigaciones sobre las aplicaciones del Ácido Hipocloroso en Endodoncia y sus propiedades antimicrobianas por las cuales se ha difundido su uso en diferentes áreas de la Medicina.

10 CONCLUSIONES

En esta investigación se obtuvieron datos en cuanto el empleo de diversas soluciones de irrigación y su asociación con medicación intraconducto a base de hidróxido de Calcio en la podemos concluir:

La utilización de Hipoclorito de Sodio mostró resultados favorables en cuanto su inactivación de endotoxinas por lo cual es una de las razones por la que es el agente irrigante más popular de gran uso en el tratamiento de endodoncia. Se recomienda investigar su combinación con otras técnicas como la activación ultrasónica y su asociación con otros agentes.

El uso de la solución de ácido Hipocloroso en estudios in vitro e in vivo ha demostrado muchas propiedades para ser considerado un agente irrigante alternativo al uso del Hipoclorito de Sodio en Endodoncia. En este estudio no se observó eficacia en inactivación endotoxinas por lo cual resaltamos la necesidad de realizar más evaluaciones mejorando la metodología para obtener resultados más contundentes.

La utilización de la medicación intraconducto como el Hidróxido de Calcio además de otras propiedades es de gran ayuda para la inactivación de endotoxinas lo que apoya para lograr mayor éxito en el tratamiento de conductos radiculares.

Se recomienda continuar con más estudios similares in vitro e in vivo y con pruebas de detección más modernas y exactas considerando que en este estudio utilizamos una prueba cualitativa, resultaría de utilidad realizar estudios con mayor exactitud y metodologías más desarrolladas para tener más información que ayude a realizar mejor la Endodoncia clínica y lograr mayor éxito en nuestros tratamientos.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Maekawa E, Valera MC, Oliveira LDD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AC. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. *Journal of Applied Oral Science*. 2011; 19: 106-12.
2. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *Journal of Endodontics* 2009; 35: 1350-53.
3. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotatory Nickel-Titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *Journal of Endodontics*. 2010; 36: 1766-69.
4. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Fihlo M, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *International Endodontic Journal*. 2003; 36: 733-39.
5. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontics irrigants and calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*. 2001; 27: 325-27.
6. Hata G-i, Uemura M, Weine FS, Toda T. Removal of smear layer in the root canal using oxidative potential water. *Journal of Endodontics*. 1996; 22: 643-45.
7. Oliveira LDD, Carvalho CAT, Carvalho A, Alves J, Valera M, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root Canals and evaluation of cytotoxic effects. *Journal of Endodontics*, 2012; 38:8
8. Marais J. Cleaning efficacy of a new root canal irrigation solution: a preliminary evaluation. *International Endodontic Journal*. 2000; 33: 320-25.
9. Solovyeva AM, Dummer H. Cleaning effectiveness of root canal irrigation with electrochemically activated anolyte and catholyte solutions: a pilot study. *International Endodontic Journal*. 2000; 33(6):494-504

10. Gulabivala K, Stock CJR, Lewsey JD, Ghori S, Ng YL, Spratt DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. *International Endodontic Journal*. 2004; 37: 624-31.
11. García F, Murray P, García-Godoy F, Namerrow KN. Effect of aquatine endodontic cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. *Journal of Applied Oral Science*. 2010; 18.
12. Rossi-Fedele G, Figueredo JAPd, Steier L, Canullo L. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model. *Journal of Applied Oral Science*. 2009; 18: 498-502.
13. La Faurie G, Del Rosario AM, Arboleda S, Escalante A, Castillo DM, Millan LV, Calderon J, Ruiz BN. Eficacia desinfectante del Ácido Hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Revista Colombiana de Investigación en Odontología*. 2009;1(1):3-11.
14. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock. *Biología de los microorganismos*. 2009: 90-91.
15. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med oral Pathol Oral Radiol Endod* 1965 Sept; 20(3) 340-349
16. Baumgartner JC. Microbiologic aspects of endodontic infections. *Journal of California Dental Association*. 2004; 32: 459-68.
17. Siqueira JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 94: 281-93.
18. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *Journal of Endodontics*. 1975; 1: 19-21.
19. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study if the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root Canals. *Journal of endodontics*. 1990 vol 16 No 7, pp 331-334

20. Nissan R, Segal, Pashley D, Stevens R, Trowbridge H. Journal of endodontics.1995;21;2 pp 62-64
21. Oliveira LDD, Carvalho CAT, Valera Ma, Koga-ito CY, Jorge AO. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. Braz Oral Rev.2005; 19:5-10
22. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zala AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. Journal of Medical Microbiology. 2005; 54: 777-83.
23. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. Journal of Endodontics. 1993; 19: 1993.
24. Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. Journal of Endodontics. 2002; 28: 694-96.
25. Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LDD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AC. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root canals. Journal of Applied Oral Science. 2011; 19: 106-12.
26. Peters L, A-J van Winkelhoff, Buijs J, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. International Endodontic Journal. 2002; 35.
27. Behnen M, West L, Liewehr F, Buxton T, Mc-Pherson JC. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. Journal of Endodontics. 2011; 27: 765-69.
28. Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani C. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin In Vivo. Journal of Endodontics. 2002; 28: 94-96.
29. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. Journal of Endodontics. 1994; 20: 127-29.

30. Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *Journal of Applied Oral Science*. 2004; 12: 93-98.
31. Safavi K, Spanberg SW, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *Journal of Endodontics*. 1990; 16: 207-09.
32. Sjogren U, Figdor D, Spanberg L, Sunqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short term intracanal dressing. *International Endodontic Journal*. 1991; 24: 119-125
33. Jiang Z, Zuo J, Chen SH, Holiday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95: 348-54.
34. Lasala, Ángel. ENDODONCIA. 3a ed. Salvat Editores. Barcelona. 1979. pp. 624
35. Karim IE, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 103: 560-69.
36. Niezgodá JA, Sordi PJ, Hermans M. Evaluation of Vashe Wound Therapy in the clinical management of patients with chronic wounds. *Skin & wound care The International Journal of Prevention and Healing*. 2010; 23: 1-6.
37. Henao-Riveros SC, Gaitan-Alvarez JA. Actividad bactericida del Ácido Hipocloroso. *Universidad Nacional de Colombia Revista Facultad de Medicina*. 2003; 51: 136-42.
38. <http://www.acciusa.com/lal/product/Research%20P333roducts/Pyrosate%c2%ae%20Kit/product.html>

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los profesores que compartieron sus enseñanzas durante este doctorado.

Al Dr. Miguel Ángel Cadena Alcántara, por su guía y consejos durante el curso de este Doctorado.

A la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez, por su confianza y apoyo incondicional en mis estudios de especialidad y hoy en este Doctorado

Al Dr. Luis Gaitán Cepeda, por sus grandes enseñanzas y consejos que fueron de gran ayuda durante este Doctorado.

A la Dra. Nico Rentería y Dra. Alicia Percevault, por su ayuda y cooperación para la realización de este proyecto.

Al Dr. Carlos Castro de la compañía Associates of Cape Cod Incorporated por su amable asesoría sobre el manejo del kit de Pyrosate®.

Al QFB Saulo Andrade, por la gran ayuda al permitir el uso de las instalaciones del laboratorio de microbiología de ANDA.

Al QFB Fernando Hernández, por su amistad y asesoría en el laboratorio de microbiología.

Muy en especial al Dr. David Jaramillo por su amistad y todas las facilidades otorgadas para poder realizar esta investigación.

A mis compañeros con los que compartí el curso de doctorado, les agradezco ser mis grandes amigos en todo momento. Y también aunque ya no se encuentre presente entre nosotros y recordando de manera muy especial a la compañera Alma Benavides, que estaría feliz de estar entre nosotros disfrutando de este momento tan especial.

ANEXOS