



**EVALUACIÓN DEL AGUA OZONIZADA COMO
IRRIGANTE COADYUVANTE DE LA ACCIÓN DEL HIPOCLORITO DE
SODIO AL 1% EN CONDUCTOS DENTARIOS INOCULADOS CON
CULTIVO DE PULPA NECRÓTICA**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Valentina Cabrera Alfaro
Joaquín Navarro Tapia
Marcela Orellana Aedo

Docente Guía: Prof. Dr. Carlos Marchant Pizarro
Cátedra de Endodoncia

Valparaíso - Chile
2016

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Marchant nuestro profesor guía por su buena disposición, disponibilidad, tiempo y orientación.

Al Dr. Jorge Torres por apoyarnos, aconsejarnos y guiarnos en todo el proceso experimental.

A Laboratorio Cheul y a los profesionales que trabajan allí por prestarnos su ayuda y su buena voluntad.

A Marcos y Verito por su buena disposición y facilitarnos todo el material bibliográfico necesario.

Al Dr. Jaime Segovia por su buena disposición en todas las correcciones

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2 -17
Capítulo I: MICROBIOLOGÍA	2-7
1. Microbiota endodóntica	2-3
2. Distribución bacteriana en el conducto radicular	4
3. Crecimiento bacteriano	4-5
3.1 Curva de crecimiento	4
3.2 Determinación del crecimiento bacteriano	5
4. Métodos de identificación microbiana	5-7
4.1 Métodos basados en tinción diferencial	5-6
4.1.1 Tinción Gram	5-6
4.2 Métodos basados en pruebas bioquímicas	6-7
4.2.1 Prueba ADNasa	6
4.2.2 Prueba de Catalasa	6
4.2.3 Prueba de la Coagulasa	6
4.2.4 Prueba de Bilis Esculina	7
4.3 Métodos basados en la resistencia a ciertas sustancias	7
4.3.1 Prueba de resistencia a Bacitracina	7
Capítulo II: IRRIGACIÓN DEL SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES	8-12
1. Objetivos de la irrigación	8
2. Requisitos del irrigante ideal	8
3. Técnica de irrigación	8-9
4. Clasificación	9-12
4.1 Hipoclorito de sodio	10
4.1.1 Concentraciones de Hipoclorito de sodio	10
4.1.2 Mecanismo de acción	11
4.1.2.1 Saponificación	11
4.1.2.2 Neutralización	11
4.1.2.3 Cloraminación	11
4.1.3 Efectos nocivos del hipoclorito	12
Capítulo III: EL OZONO	13-17
1. Historia	13
2. Composición	13
3. Síntesis del Ozono	13-14
3.1 El equipo de Ozono Odontológico MWM D-3000	14
4. Mecanismos de acción terapéutica del ozono	15-16
4.1 Acción antimicrobiana	15
4.2 Acción inmunoestimulante	15
4.3 Acción anti-hipóxica	15
4.4 Acción analgésica	16
4.5 Acción antiinflamatoria	16

4.6 Bioenergética y acción biosintética	16
5. Usos del ozono en odontología	16
6. Vías de administración del ozono	16-17
6.1 Ozono gaseoso	16
6.2 Agua ozonizada	17
6.3 Aceite ozonizado	17
III. OBJETIVOS	18
IV. HIPOTESIS	18
V. DISEÑO METODOLÓGICO	19-32
1. Muestra y universo	19-20
1.1 Diseño de estudio	19
1.2 Definición	19
1.3 Determinación del tamaño muestral	19
1.4 Selección de muestra	20
1.4.1 Definición de muestra	20
1.4.2 Criterios de inclusión y selección	20
1.4.3 Criterios de exclusión	20
2. Desarrollo del estudio	20-32
ETAPA 1: Recolección dentaria	20
ETAPA 2: Selección dentaria	21-22
2.1 Corte coronario	21
2.2 Prueba Lima#20	21
2.3 Radiografías con lima k#15	21-22
ETAPA 3: Preparación dentaria	22-23
3.1 Montaje e identificación	22
3.2 Instrumentación con sistema WaveOne TM	22
3.3 Esterilización y almacenamiento	23
ETAPA 4: Extracción pulpa necrótica	23
ETAPA 5: Recuento bacteriano y frotis del cultivo madre	23-26
5.1 Recuento bacteriano del cultivo madre	23-25
5.2 Frotis del cultivo madre	26
ETAPA 6: Inoculación dentaria con cultivo madre	26
ETAPA 7: División aleatoria de raíces y formación de grupos de estudio	26-27
ETAPA 8: Obtención, recuento de colonias bacterianas y frotis de CI	27-28
8.1 Obtención cultivos iniciales	27
8.2 Recuento bacteriano y frotis de los cultivos iniciales	28
ETAPA 9: Irrigación	28-29
ETAPA 10: Obtención, recuento de colonias bacterianas y frotis CF	29-30
10.1 Obtención de cultivos finales	29
10.2 Recuento de colonias y frotis de los cultivos finales	30
ETAPA 11: Identificación bacteriana	30-32
11.1 Pruebas de identificación microscópica	30-32

11.2 Pruebas de identificación bioquímicas	32
11.3 Pruebas de identificación basadas en la resistencia a ciertas sustancias	32
VI. RECOLECCIÓN DE DATOS	33-36
1. Variables estadísticas	33
2. Definiciones conceptuales y operacionales	34-35
3. Instrumento o índices	35
4. Informe deserciones y duración del estudio	35
5. Aprobación comité de ética y bioseguridad	36
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
1. Tipo de estudio estadístico	37
2. Test a utilizar y Programa estadístico	37
VIII. RESULTADOS	38-44
1. Pruebas Cuantitativas	38-42
2. Pruebas Cualitativas	43-44
2.1 Pruebas de identificación microscópica del cultivo madre, cultivos iniciales, cultivos finales y colonias bacterianas representativas	43
2.2 Pruebas de Identificación bioquímicas y de resistencia a ciertas sustancias	44
IX. DISCUSIÓN	45-48
X. CONCLUSIÓN	49
XI. RESUMEN	50
XII. BIBLIOGRAFÍA	51-54
XIII ANEXOS	55-62
1. Selección dentaria	55
2. Protocolo WaveOne™	56-57
3. Normas de bioseguridad de la Facultad de Odontología Universidad de Valparaíso 2015	58-60
4. Consentimiento Informado	61-62
5. Resultados estadísticos	

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos del tratamiento endodóntico es lograr la eliminación de los microorganismos que colonizan el sistema de conductos radiculares (SCR); para lograrlo se utiliza en conjunto la instrumentación mecánica y el tratamiento químico, este último incluye protocolos de irrigación y medicación tópica intraconducto.

En la terapia endodóntica la irrigación forma parte del tratamiento químico y es una de las etapas más importantes, ya que es la responsable del 60% de la limpieza y desinfección del sistema de conductos. Aunque sea definida como un procedimiento auxiliar de la instrumentación mecánica, su uso es indispensable debido al difícil acceso y la alta complejidad anatómica del SCR.

La irrigación ejecuta tres funciones principales que por sí sola la preparación biomecánica no podría llevar a cabo, en primer lugar elimina por disolución los detritos preexistentes y aquellos creados como consecuencia de la instrumentación, en segundo lugar reduce la carga bacteriana del SCR gracias al acto mecánico de lavado y efecto antibacteriano propio de la sustancia utilizada, y por último hidrata y lubrica las paredes dentinarias facilitando la instrumentación mecánica.

Con el transcurso del tiempo y el avance de la tecnología se han utilizado y desarrollado distintas sustancias químicas y combinaciones de estas, estableciendo secuencias y sistemas de irrigación especializados con el fin de hacer más eficiente el procedimiento.

Durante décadas el hipoclorito de sodio se ha considerado el irrigante universal debido a su alta eficacia, existiendo diferentes concentraciones de este irrigante, concentraciones menores (0,5% a 1%) disuelven principalmente tejido necrótico con un porcentaje bactericida menor, mientras que en concentraciones máximas (hasta 5.25%) tienen un efecto bactericida cercano al 100% pero a costa de la disolución de material orgánico tanto necrótico como vivo, esto último corresponde a la principal desventaja del hipoclorito, su citotoxicidad. Además existe el riesgo de extrusión hacia los tejidos periapicales generando reacciones alérgicas, dolor, edema, enfisema facial y formación de hematomas entre otros.

Es por esto que en ocasiones se ha utilizado en combinación con una variedad de sustancias para potenciar sus cualidades y disminuir sus efectos no deseados.

Como una alternativa más actual de irrigantes encontramos el agua ozonizada, la cual es un poderoso agente oxidante utilizado para eliminar bacterias del SCR, esta corresponde, junto a las otras formas de ozono, a una de las nuevas generaciones de los agentes desinfectantes. Diversos estudios han demostrado que puede ayudar a la desinfección del SCR y además a mejorar el postoperatorio, estimular la respuesta inflamatoria innata y acelerar el proceso de sellado biológico de los pacientes.

Considerando al hipoclorito de sodio como el irrigante Gold estándar en endodoncia e intentando disminuir sus efectos nocivos disminuyendo su concentración y coadyuvándolo con el agua ozonizada, cabe preguntarse ¿El uso de agua ozonizada coadyuvará el efecto bactericida del hipoclorito de sodio al 1%?

II. MARCO TEÓRICO

Capítulo I:

MICROBIOLOGÍA

La Microbiología es la rama de la biología que estudia los microorganismos, bajo esta denominación se encuentran especies celulares como bacterias, algas, hongos y protozoos; y microorganismos sub o acelulares como virus y priones¹.

Los microorganismos son esenciales en el desarrollo de enfermedades perirradiculares y son los factores mayormente asociados a fracasos endodónticos.

En los últimos veinte años se ha obtenido mucha información sobre la microbiología de las infecciones endodónticas, estas suelen desarrollarse tras la necrosis pulpar y la falta de tratamiento de la misma. Aunque en estas infecciones se han encontrado hongos, arqueas y virus, las bacterias son los principales microorganismos implicados².

Estas comunidades microbianas pueden sobrevivir y reproducirse en el tejido orgánico remanente de la pulpa y del exudado del periodonto, encontrando condiciones ecológicas ideales en el ambiente bajo en oxígeno del sistema de conductos radiculares³.

Los anaerobios estrictos son fáciles de erradicar durante el tratamiento de los conductos radiculares, pero las bacterias facultativas sobreviven con mayor probabilidad a la instrumentación e irrigación del conducto radicular⁴.

1. Microbiota Endodóntica

Hasta la década del 1970, la mayoría de los autores citaba a los *Streptococcus viridans* como la especie más prevalente en la infección pulpar, seguido por *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*. Con el desarrollo de las técnicas para bacteriología anaerobia, se comenzaron a detectar frecuentemente más especies anaerobias⁵.

Las comunidades bacterianas que se encuentran en la boca son muy complejas con participación de alrededor de 1.000 especies⁶, pero actualmente se describe un número limitado de microorganismos en la infección endodóntica, desde una a doce especies. Esto indica que existen determinantes ecológicos a nivel de la pulpa y el periápice, cuya presión selectiva va a definir qué microorganismos serán capaces de colonizar esos tejidos. Se describen estos determinantes como el potencial de óxido reducción, la disponibilidad de nutrientes, y las interacciones microbianas de sinergismo y antagonismo⁷.

Además de las bacterias, otros microorganismos como hongos y virus pueden ser encontrados en las infecciones endodónticas, aunque es más frecuente en dientes con retratamiento⁸.

A través de las técnicas de cultivo y biología molecular se ha confirmado el carácter polimicrobiano de la infección endodóntica, con un predominio marcado de bacterias anaerobias estrictas en las infecciones primarias. El 40%-55% de las bacterias de la microbiota endodóntica no se han podido cultivar².

Los microorganismos aislados más frecuentemente en infecciones de pulpa vital son: *S. aureus*, *Streptococcus orales*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter*, *Eikenella*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Mitsuokella*, *Selenomonas*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Treponemas orales*⁵.

La infección de la pulpa necrótica se puede producir por las mismas vías que la pulpa vital, pero la extensión de la infección es incontrolable ya que los mecanismos de defensa del hospedero son incompetentes. Normalmente al inicio de la necrosis pulpar se aísla un promedio de seis especies bacterianas, mientras que en la infección exacerbada pueden aislarse entre doce y quince, predominando especies de los géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*⁵. A continuación se muestran las bacterias más frecuentes aisladas en pulpa necrótica.

	Géneros	Especies
Bacterias anaerobias estrictas		
Bacilos gramnegativos	<i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i>	<i>P. gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> <i>P. oris</i> , <i>P. buccae</i> <i>P. intermedia</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. nigrescens</i>
	<i>Mitsuokella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Selenomonas</i>	<i>M. dentalis</i> <i>F. nucleatum</i> <i>S. sputigena</i>
Bacilos grampositivos	<i>Eubacterium</i>	<i>E. lentum</i>
Cocos gramnegativos	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. micros</i> , <i>P. anaerobius</i> , <i>P. prevotii</i> , <i>P. asaccharolyticus</i> , <i>P. magnus</i>
Cocos grampositivos	<i>Veillonella</i>	<i>V. parvula</i>
Espiroquetas	<i>Treponema</i>	<i>T. denticola</i>
Bacterias anaerobias facultativas		
Cocos grampositivos	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. intermedius</i> <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
Bacilos gramnegativos	<i>Campylobacter</i> <i>Eikenella</i> <i>Capnocytophaga</i>	<i>C. rectus</i> <i>E. corrodens</i> <i>C. ochracea</i>
Bacilos grampositivos	<i>Lactobacillus</i> <i>Actinomyces</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L.</i> <i>fermentum</i> <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. meyeri</i>

Tabla I. Bacterias aisladas frecuentemente en la pulpa necrótica⁵

2. Distribución bacteriana en el conducto radicular

La infección del sistema de conductos es un proceso dinámico y diferentes especies bacterianas parecen dominar en diferentes fases del mismo. En las fases más tempranas del proceso infeccioso pulpar predominan las bacterias facultativas. Al cabo de algunos días o semanas disminuye el oxígeno en el interior del conducto radicular a causa de la necrosis pulpar y el consumo por las bacterias facultativas, se crea así un entorno anaerobio con un potencial redox reducido, lo que favorece la sobrevivencia y desarrollo de las bacterias anaerobias estrictas, con el paso del tiempo se acentúan las condiciones anaeróbicas, sobre todo en el tercio apical del conducto radicular, y las bacterias anaerobias pasan a dominar la microbiota superando el número de bacterias facultativas. La distribución de las bacterias en los conductos radiculares es equitativa predominando gérmenes aerobios en el tercio coronario del conducto, anaerobios facultativos en el tercio medio y anaerobios estrictos en el tercio apical².

3. Crecimiento bacteriano

Se entiende como crecimiento o desarrollo el aumento ordenado de todos los componentes químicos de una célula. En bacteriología, el término crecimiento hace referencia al incremento del número de células y no al tamaño (éste no varía significativamente a lo largo de la vida de la bacteria excepto cuando se encuentra en división). Al dividirse la mayoría de las bacterias por fisión binaria, cada célula origina dos, dos originan cuatro, cuatro originan ocho, etc; el crecimiento bacteriano es, pues, una función exponencial. Para que este proceso ocurra, las bacterias tienen que estar en un ambiente donde sean capaces de desarrollar todas sus funciones metabólicas y sintetizar todos los compuestos que necesitan a partir de los nutrientes del medio; se produce así lo que se denomina un crecimiento equilibrado, que normalmente sólo se consigue en medios de cultivo⁹.

3.1. Curva de crecimiento

Si se introduce en un medio de cultivo líquido una población bacteriana, procedente toda ella de la misma célula madre, y el sistema es cerrado, es decir, ni se añaden ni se eliminan sustancias de desecho, se genera una curva de crecimiento con las etapas que se indican a continuación¹⁰:

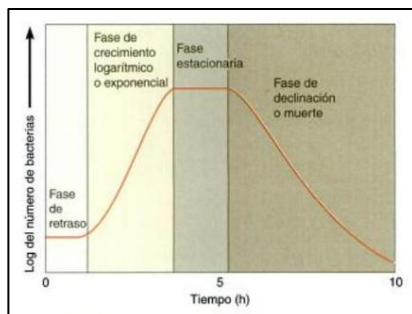


Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano¹⁰

3.2 Determinación del crecimiento bacteriano

La medición del crecimiento sirve para determinar las bacterias presentes en un cultivo o en un hábitat natural o patológico. Se puede realizar de forma directa, mediante determinación del número celular, con métodos de recuento de placa, técnica del número más probable, método de filtración, recuento de cámara y clitómetro de flujo; o de manera indirecta, sin contar las células, con métodos de medición de peso, analíticos o de turbidimetría^{10,11}.

El método directo de recuento de placa no mide el número total de células sino únicamente las viables. Se efectúa en placas de Petri que contengan el medio de cultivo idóneo para el desarrollo del tipo de bacteria que se investiga, se realiza mediante una siembra en masa de una cantidad conocida de la muestra problema; para ello debe distribuirse uniformemente el inóculo sobre la superficie del medio. Tras la inoculación apropiada se cuentan las colonias que crezcan, suponiendo que una bacteria al multiplicarse dará origen a una colonia o unidad formadora de colonias (UFC). Si se sospecha que la cantidad de bacterias es elevada, habrá que efectuar una dilución de la muestra. Para ello se preparan diluciones y se siembra un determinado volumen en la superficie del medio contenido en las placas de Petri, tras la inoculación correspondiente, se calcula el número de células viables aplicando la fórmula:

$$\text{nº de células viables} = \frac{\text{nº de colonias}}{\text{dilución} \times \text{volumen}}$$

Figura 2. Fórmula para calcular número de células viables⁵

Por ejemplo si en la dilución 10^3 se cuentan 28 colonias, inoculando 0,1 ml en cada placa, el número de células viables en la muestra problema será de 28×10^4 UFC/ml, como es obvio, deben elegirse aquellas placas en las que el recuento sea posible (sin crecimiento confluyente), hacer el cálculo con varias diluciones y al final establecer una media¹¹.

4. Métodos de identificación microbiana

Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un microorganismo¹². A continuación se describen distintas técnicas de identificación:

4.1 Métodos basados en tinción diferencial

4.1.1 Tinción de Gram

Para realizar este tipo de tinción se debe seguir la siguiente secuencia: el frotis bacteriano se fija con calor, se tiñe con cristal violeta por un minuto, se lava con agua, se le aplica un mordiente por un minuto y se lava nuevamente con agua, después se

decolora con una mezcla alcohol etílico/acetona. Escurrir y cubrir con safranina (color de contraste) durante un minuto y luego lavar y secar.

Las bacterias Gram positivas y Gram negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la células Gram positivas es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram negativas se componen de una capa delgada de peptidoglicano, por lo cual estos dos tipos de bacterias se tiñen de diferente color y es posible identificarlas como Gram positivas si se tiñen de color violeta o Gram negativas si se tiñen de color rojo¹³.

4.2 Métodos basados en pruebas bioquímicas

4.2.1 Prueba de la ADNasa

Es utilizada para identificar *Staphylococcus* potencialmente patógenos; manifiesta la actividad de la desoxirribonucleasa, la cual es indicadora de su patogenicidad.

Asimismo, se investiga la capacidad del microorganismo de producir enzimas que hidrolicen el ADN. La aparición de halos transparentes alrededor del área de crecimiento se considera resultado positivo, ya que estas corresponden a zonas de hidrólisis del ADN. La prueba es considerada negativa en caso de que los halos característicos no estén presentes¹⁴.

4.2.2 Prueba de la Catalasa

Se utiliza para probar la capacidad del microorganismo de producir la enzima catalasa, las bacterias aerobias y anaerobias facultativas producen catalasa, la cual facilita la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, siendo de utilidad para evitar la formación de radicales tóxicos por el sistema de la mieloperoxidasa en las células fagocíticas. La prueba es positiva cuando la bacteria reacciona produciendo la liberación de burbujas, que es la característica dada por la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno¹⁴.

4.2.3 Prueba de la Coagulasa

Esta prueba se emplea para determinar y diferenciar especies dentro del género *Staphylococcus*, así como para probar la existencia de *S. aureus*. Dicho microorganismo tiene la capacidad de activar dicha enzima. La coagulasa es un factor de agregación y constituye una prueba muy sensible y específica para esta bacteria. Esta proteína representa un importante factor de virulencia. La coagulasa puede unirse al fibrinógeno y convertirlo en fibrina insoluble, la cual tiende a formar depósitos donde los *Staphylococcus* pueden agregarse. La prueba puede hacerse de dos maneras: en portaobjeto, en la cual la solución se ha tratado previamente con ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA) y plasma de conejo. Por otra parte, la prueba se puede realizar en tubo, para lo cual se inoculan 0.5 ml de una dilución de plasma de conejo con la colonia sospechosa¹⁴.

4.2.4 Prueba de Bilis Esculina

Es un medio selectivo y diferencial que se usa para aislar e identificar un gran número de miembros del género *Enterococcus* y también *Streptococcus*. Las sales biliares son el ingrediente selectivo, mientras que la esculina es el componente diferencial. Los *Enterococcus* hidrolizan la esculina en unos subproductos que reaccionan con el citrato férrico que contiene el medio, produciendo sales insolubles de hierro que resultan en un ennegrecimiento del medio. Los resultados del test deben ser interpretados junto a una morfología de tinción de Gram¹³.

4.3 Métodos basados en la resistencia a ciertas sustancias

4.3.1 Prueba de Resistencia a la Bacitracina

La bacitracina es un antibiótico que inhibe la síntesis de pared celular bacteriana. Esta prueba es utilizada para la diferenciación del *Streptococcus beta hemolítico del grupo A* de otros *Streptococcus beta hemolíticos*. Sus resultados se interpretan si es que existe o no presencia del halo de inhibición del desarrollo alrededor del disco (independientemente del diámetro)¹³.

Capítulo II:

IRRIGACIÓN DEL SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES

La irrigación consiste en el lavado del sistema de conductos radiculares (SCR) y aspiración de los restos y sustancias que puedan estar contenidos en la cámara pulpar y/o conductos radiculares, empleando una o más soluciones de diversa composición química utilizadas para la desinfección y limpieza del SCR¹⁵.

La morfología del SCR genera dificultades al profesional para lograr el total debridamiento del contenido, ya que con la sola instrumentación manual no se tiene acceso a todas las estribaciones de éste. Por tal razón es necesario utilizar sustancias irrigantes o secuencias de estos que permitan llegar a estas zonas con el fin de obtener una mejor desinfección del SCR¹⁵.

1. Objetivos de la irrigación

Entre los objetivos de la irrigación tenemos en primer lugar la limpieza, que consiste en eliminar por remoción y/o disolución los detritos presentes en el interior del SCR, ya sean preexistentes o creados como consecuencia de la instrumentación. En segundo lugar se encuentra la desinfección, con la cual se busca reducir la cantidad de bacterias existentes en el SCR por el acto mecánico del lavado y por la acción antibacteriana de la sustancia. Y finalmente la lubricación, con la cual se facilita la acción conformadora de los instrumentos endodónticos por mantener las paredes dentinarias hidratadas y ejercer una acción lubricante¹⁶.

2. Requisitos del irrigante ideal

Dentro de los requisitos que debería cumplir el irrigante ideal tenemos que deberá poseer un amplio espectro microbiano, alta eficacia contra microorganismos anaerobios y facultativos organizados en las biopelículas, capacidad de disolver restos de tejido pulpar necrótico, capacidad para inactivar endotoxinas, capacidad para prevenir la formación de una capa de barrillo durante la instrumentación, sistémicamente no tóxicos cuando entran en contacto con los tejidos vitales, no cáustico a los tejidos periodontales, y con poco potencial de causar una reacción anafiláctica¹⁷.

A lo largo de la historia diferentes agentes irrigantes han sido utilizados, entre éstas, una de las soluciones de irrigación más populares es el hipoclorito de sodio (NaOCl)¹⁸.

3. Técnica de Irrigación

Durante la técnica de irrigación se deben llevar las soluciones a la zona apical del conducto y, al mismo tiempo aspirar con una cánula de diámetro moderado para ejercer el efecto de succión cerca de la entrada de los conductos¹⁹.

En general existe el consenso de que para que un irrigante tenga un efecto importante se deben usar agujas de pequeño calibre y que puedan llegar idealmente a

la longitud de trabajo menos un milímetro, ya que es esto el radio de acción del irrigante dentro del SCR²⁰. Al insertar una aguja endodóntica no se debe taponar el conducto ya que de hacerlo existe un alto riesgo de extrusión del líquido, tampoco se debe ejercer presión, la aguja debe estar en todo momento holgada dentro del SCR¹⁵.

Los irrigantes se deben dejar actuar durante un tiempo que varía entre uno a cinco minutos ya que es conveniente permitir la renovación constante de irrigación¹⁵.

Hoy en día ningún irrigante cuenta con todos los requisitos de un irrigante ideal, una alternativa son las secuencias de irrigantes que buscan utilizar las propiedades positivas de cada uno en un mismo tratamiento disminuyendo así las probabilidades de dejar bacterias viables dentro del SCR¹⁵.

4. Clasificación

Las soluciones y sustancias usadas en endodoncia son²⁰:

Clasificación	Solución
Compuestos halógenos	<ul style="list-style-type: none"> • Solución de hipoclorito de sodio 0,5 a 5,25% • Solución de Gluconato de Clorhexidina al 2%
Detergentes sintéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Duponol C – al 1 (alquil – sulfato de sodio) • Zefirol – cloruro de alquildimetil – bencilamonio (cloruro de 3. Benzalconium) • Dehyquart – A (cloruro de cetiltrimetilamonio) • Tween – 80 (Polisorbato 80)
Quelantes	<ul style="list-style-type: none"> • Soluciones de ácido etilendiaminotetracético – EDTA • Largal ultra (agente quelante comercial) • Redta (agente quelante comercial)
Asociaciones	<ul style="list-style-type: none"> • RC Prep (Ácido etilendiaminotetracético + peróxido de urea + base hidrosoluble e polietilenglicol – Carbowax) • Endo – PTC (peróxido de urea + Tween 80 + Carbowax) • Glyde File Prep • MTAD –(Asociación de una tetraciclina isomérica, ácido cítrico y un detergente–Tween80) • Smear Clear
Otras soluciones de irrigación	<ul style="list-style-type: none"> • Agua destilada esterilizada • Agua de hidróxido de calcio – 0.14 g% • Peróxido de hidrogeno – 10 vol. • Suero fisiológico • Solución de ácido cítrico • Agua ozonizada

Tabla II. Clasificación de Irrigantes endodónticos²⁰

4.1 Hipoclorito de Sodio

El NaOCl es el agente irrigante más estudiado en la endodoncia, siendo a su vez el *gold standar* de los irrigantes, a pesar de su recurrente uso en endodoncia, este irrigante no se encuentra aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) debido a su alta toxicidad, potencial cáustico, riesgo de provocation de enfisemas si es extruido y alergias de parte de los pacientes²¹.

4.1.1 Concentraciones de Hipoclorito de sodio²²

- **Solución de Dakin:** NaOCl al 0,5% (Neutralizado con ácido bórico)
- **Solución de Dausfrene:** NaOCl al 0,5% (Neutralizado con Bicarbonato de Sodio)
- **Solución de Milton:** NaOCl al 1%
- **Solución de Labarraque:** NaOCl al 2,5%
- **Solución de Grossman:** NaOCl al 5%
- **Solución de NaOCl al 5.25%** (preparación oficial, USP)

La acción bactericida y de disolución de tejidos del NaOCl puede ser modificada por tres factores: concentración, temperatura y pH de la solución²³.

Se ha estudiado la efectividad de diferentes concentraciones de NaOCl con respecto a su acción solvente y bactericida. Varios investigadores están de acuerdo en que las soluciones con una concentración más alta de NaOCl son más efectivas que las soluciones con concentraciones más baja^{24,25,26,27}

El NaOCl al 1% (solución de Milton) es la más utilizada según la literatura, por las importantes propiedades que brinda en la irrigación intracanal¹⁵.

El NaOCl en concentraciones inferiores a 2.5% actúa eficazmente eliminando los microorganismos, pero debe utilizarse durante un tiempo prolongado durante el tratamiento para disolver los restos pulpares²³.

El NaOCl al 2.5% y 5.25 % son soluciones más inestables, por ser más concentradas, su método de almacenamiento es un factor importante ya que el producto puede verse afectado ante la exposición a luz, el calor y el medio ambiente²³.

Se afirma que la única concentración capaz de remover físicamente la capa de biofilm y volver no viables las bacterias es el NaOCl al 6%²⁵; por su parte, otros autores encontraron que la solución al 5% disuelve los tejidos pulpares necróticos más rápido que la solución al 2,5%²⁸. Sin embargo, en otro estudio se encontró que la concentración del NaOCl no es tan importante como el cambio constante de la solución y su uso en cantidades significativas²⁹.

Estudios han demostrado que la capacidad antibacteriana y disolventes de una solución de NaOCl al 5,25% disminuyen cuando la misma es diluida, al mismo tiempo reducen sus efectos tóxicos; así una solución al 5% es fuertemente bactericida, pero altamente tóxica y una solución al 0,5%, aunque menos irritante, sus efectos antimicrobianos están disminuidos^{26, 30,31}.

4.1.2 Mecanismo de acción^{17,30}

Las acciones del hipoclorito de sodio operan mediante tres mecanismos⁷:

4.1.2.1 Saponificación: donde actúa como solvente graso y orgánico, saponifica los ácidos grasos dividiéndolos en sales y glicerol, reduciendo la tensión superficial de la solución.

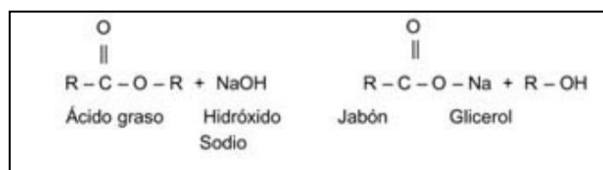


Figura 3. Mecanismo de acción hipoclorito de sodio, reacción de saponificación⁷

4.1.2.2 Neutralización: cuando el ácido hipocloroso toma contacto con tejido orgánico libera cloro, el cual se une a los grupos amino liberados de la hidrolización de aminoácidos formando cloraminas. Será el ácido hipocloroso y los iones de hipoclorito quienes lleven a la degradación proteica e hidrólisis.

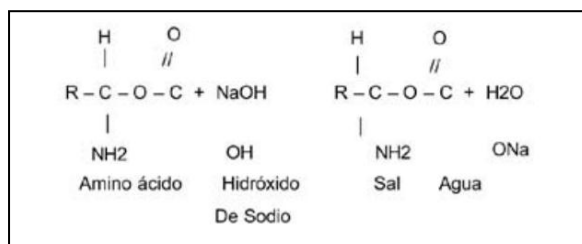


Figura 4. Mecanismo de acción hipoclorito de sodio, reacción de neutralización⁷

4.1.2.3 Cloraminación: algunas de las cloraminas sintetizadas son capaces de interferir con el metabolismo celular. Por su parte, el cloro es un potente oxidante y tiene un gran potencial antimicrobiano, inhibiendo las enzimas bacterianas y llevando a la oxidación irreversible de los grupos sulfhidrilos.

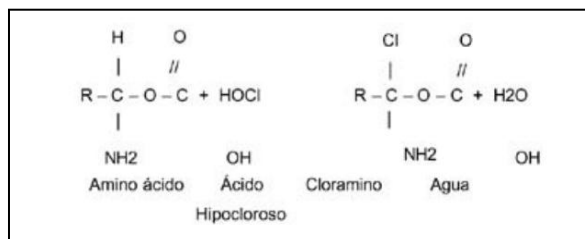


Figura 5. Mecanismo de acción hipoclorito de sodio, reacción de cloraminación⁷

4.1.3 Efectos nocivos del hipoclorito

El NaOCl presenta un gran número de propiedades negativas como la corrosión del instrumental endodóntico, ineffectividad para algunos microorganismos cuando es utilizado a bajas concentraciones, por sí solo no remueve el barro dentinario ya que solo actúa sobre la materia orgánica de la pulpa y de la predentina; además presenta el riesgo de sobrepaso de NaOCl a los tejidos periapicales y es potencialmente alérgico y citotóxico^{15,20,21,29,30,32}

Las investigaciones *in vitro* y en animales han demostrado efectos tóxicos del NaOCl en tejidos vitales. Estos efectos son hemólisis, ulceración cutánea, daño celular severo en células endoteliales y fibroblastos e inhibición de la migración neutrófila^{23,31,34,35,36}.

Si el NaOCl es ingerido se absorbe en forma de cloruro, el cual pasa a la sangre y es excretado por el riñón. Aun así, su ingesta provoca efectos irritantes sobre el tracto digestivo, especialmente si son soluciones concentradas. Es irritante para la piel y el tejido subcutáneo, en el cual provoca citotoxicidad en fibroblastos y células endoteliales, y reacción a cuerpo extraño³⁶.

Su sobrepaso hacia la zona perirradicular ha sido reportada como causante de dolor, edema, enfisema facial y formación de hematomas. Otro reporte fue el de inyección cerca del nervio dentario inferior que añadió a los síntomas trismus de dos semanas^{35,36}

Capítulo III:

EL OZONO

1. Historia

Fue detectado en 1785 por el físico Von Marum, gracias a su olor característico. Más adelante en 1840 el físico Schöbein bautiza esta sustancia como ozono (O_3), proveniente de la palabra alemana "Ozein", que se traduce como "olor". En 1857 Von Siemens fabricó el primer generador de O_3 , el cual permitió estudiar sus propiedades y efectos químicos. En 1870 el médico alemán Lender realizó la primera publicación sobre los efectos biológicos referidos a la desinfección de aguas. El descubrimiento de las propiedades antimicrobianas de la molécula revolucionó la medicina de la época generando desde esta instancia en adelante su utilización en el área industrial y médica, fundándose instituciones para la desinfección de aguas y departamentos de ozonoterapia. Por primera vez en 1932 en Suiza un odontólogo, el Dr. Fish, publica sus aplicaciones en odontología como tratamiento de caries, y patenta el primer aparato específico para esta aplicación, seguido por el odontólogo Dr. Payr quien publicó "Aplicaciones del ozono en cirugía", premiado por la asociación alemana de cirugía, actualmente se realizan múltiples ensayos clínicos, estudios experimentales, tesis doctorales e investigaciones referentes al uso del O_3 en áreas como la medicina y odontología en diferentes países del mundo³⁸.

2. Composición

El O_3 es una molécula triatómica, compuesta por tres átomos de oxígeno. Su peso molecular es 47,98 g/mol. Es altamente inestable termodinámicamente, dependiendo de las condiciones del sistema como la temperatura y la presión se descompone a oxígeno puro con una vida media corta³⁹.

El O_3 es una modificación alotrópica de oxígeno (O_2) que puede existir en las tres condiciones físicas de la materia. En condiciones normales, el O_3 es un gas incoloro con un olor acre⁴⁰.

3. Síntesis del ozono

En la naturaleza el O_3 es creado por una combinación de O_2 en el aire bajo la influencia de factores tales como la radiación ultravioleta (del sol) y las descargas eléctricas (rayos). También es creado en las zonas donde hay una intensa tensión física en el agua (tales como cascadas y las olas del mar rompiendo en las rocas)⁴¹.

De manera artificial existen tres sistemas diferentes para la generación de gas O_3 . El primero es el sistema de luz ultravioleta que produce bajas concentraciones de O_3 y es utilizada en estética y purificación de aire. Secundariamente el sistema de plasma frío que se utiliza en la purificación del aire y el agua. Y finalmente el sistema de efecto corona (Corona discharge) que produce altas concentraciones de O_3 , este es el sistema más común utilizado en el campo médico – dental, es fácil de manejar y tiene una tasa de producción de O_3 controlada⁴¹.

Debido a la inestabilidad de la molécula de O_3 éste debe prepararse inmediatamente antes de su uso, ya que al pasar una hora solo la mitad se mantiene como molécula de O_3 y la otra se convierte en O_2 . Con el fin de controlar su descomposición el O_3 puede ser asociado a un vehículo con propiedades acuosas para promover su conversión rápida o a un vehículo más viscoso para retardar su conversión⁴².

3.1 El equipo de ozono odontológico MWM D-3000

Una forma de obtención del agua ozonizada (H_2O_3) se realiza a través de la maquina GO_3 Advance de origen Chileno, esta empresa se dedica a fabricar dos equipos de O_3 , uno para medicina y otro para odontología, el dispositivo para odontología es el MWM D-300, y genera H_2O_3 a partir de O_2 médico combinándolo con agua bidestilada⁴³.



Figura 6. Equipo de O_3 odontológico MWM D-3000 (GO_3 Advance)

Las principales características del MWM D-3000 corresponden a que es un sistema de O_3 completamente integrado, 100% libre de químicos y bi-productos tóxicos, con una concentración de O_3 de 120 $\mu\text{g/ml}$, utiliza sólo O_2 de grado médico y con un caudal regulado a un litro por minuto⁴³.

4. Mecanismos de acción terapéutica del ozono

Existen varios mecanismos de acción del O_3 sobre el cuerpo humano a continuación se describirán uno a uno.

4.1 Acción antimicrobiana

El O_3 funciona como bactericida natural, inactiva bacterias, virus, hongos, levaduras y protozoos. El O_3 en esta forma es muy inestable y se disocia fácilmente de nuevo en O_2 , esta reacción genera la liberación de O_1 el cual es un fuerte agente oxidante. Este agente oxidante actúa sobre la membrana citoplasmática de la célula produciendo ozonólisis de enlaces dobles y también modificación inducida por O_3 de los contenidos intracelulares (oxidación de las proteínas y pérdida de función de los organelos) debido a los efectos secundarios de los oxidantes, esta acción no es específica ni selectiva para las células microbianas, no daña a las células del cuerpo debido a su capacidad antioxidante. El O_3 además es muy eficiente en cepas resistentes a los antibióticos y aumenta su actividad antimicrobiana en ambiente de pH ácido⁴⁴.

Las bacterias Gram positivas son más sensibles a la acción de O_3 que las Gram negativas. Las bacterias anaerobias también son sensibles al O_3 ⁴².

4.2 Acción inmunoestimulante

Estimula la proliferación de las células inmunes y síntesis de inmunoglobulinas. También activa la función de los macrófagos y aumenta la sensibilidad de los microorganismos a la fagocitosis⁴⁴.

4.3 Acción anti-hipóxica

El O_3 genera el aumento de la presión parcial de oxígeno (pO_2) en los tejidos y mejora el transporte de O_2 en la sangre, lo que resulta en el cambio del metabolismo celular, la activación de los procesos aeróbicos (glucólisis, ciclo de krebs, β -oxidación de los ácidos grasos) y el uso de los recursos energéticos⁴⁴.

Las dosis bajas de O_3 activan enzimas superóxidos (catalasa, deshidrogenasas y peroxidasas) las cuales son parte de los sistemas enzimáticos complejos que protegen los organismos contra la acción de los radicales libres de O_2 ⁴².

El O_3 actúa sobre los eritrocitos aumentando la superficie de contacto para el transporte de O_2 . Además cambia la estructura de su membrana celular aumentando su elasticidad⁴⁴.

4.4 Acción analgésica

Estos efectos se deben a la facultad del O_3 en altas concentraciones de generar una menor producción de mediadores de la inflamación, la oxidación (inactivación) de metabolitos, mediadores del dolor (ácido araquidónico y prostaglandinas) y la mejoría de la microcirculación sanguínea local mejorando la entrega de O_2 a los tejidos y

eliminando toxinas.

Un estudio realizado el año 2013 muestra que los pacientes con terapia de O₃ no tomaron la misma cantidad de analgésicos que el grupo que no había sido ⁴⁵.

4.5 Acción antiinflamatoria

Por otro lado el O₂ en bajas concentraciones posee un efecto inmunoestimulante provocando la síntesis de sustancias biológicamente activas tales como interleuquinas, leucotrienos y prostaglandinas que es beneficioso tanto para la reducción de la inflamación como la cicatrización ⁴⁴.

En otro estudio publicado el año 2007 se demuestra que el H₂O₃ tiene una excelente capacidad antiinflamatoria lo que disminuye las molestias sobre heridas y procesos infecciosos ⁴⁶.

4.6 Bioenergética y acción biosintética

Activa los mecanismos de la síntesis de proteínas, aumenta la cantidad de ribosomas y mitocondrias celulares. Estos cambios aumentan la actividad funcional y regeneración potencial de tejidos y órganos ⁴⁴.

5. Usos del ozono en la odontología

El O₃ se puede utilizar como agente desinfectante, en control de sangrado, para limpieza de heridas en tejidos duros y blandos, mejora cicatrización (incrementando nivel de O₂ en la zona de la herida), como enjuague bucal y spray en caso de gingivitis, aftas, estomatitis, desinfección localizada, caries y cirugía general) y finalmente como irrigante para tratamientos de endodoncia ⁴².

6. Vías de administración del ozono

6.1 Ozono gaseoso

Se utiliza con mayor frecuencia en odontología restauradora y endodoncia. En terapia mínimamente invasiva de caries se usa como un desinfectante antes de la colocación de una restauración directa y como terapia para los dientes hipomineralizados ⁴⁷.

6.2 Agua ozonizada

Ha demostrado ser eficaz contra bacterias, hongos y virus, dado que se ha encontrado que el O₃ tiene efectos negativos si se inhala en el tracto respiratorio por lo que el H₂O₃ es una opción de tratamiento más segura ³⁸.

En el ámbito de la endodoncia diversos estudios han reflejado una clara efectividad del H₂O₃. Se concluye que el H₂O₃ es efectiva contra *S. aureus* y *Pseudomona aeruginosa* demostrando ser un potente bactericida en poco tiempo de exposición (30 segundos) ⁴⁸.

Otra investigación concluye que para *Enterococcus faecalis*, si combinamos el H₂O₃ con el ultrasonido es igual de efectiva que el NaOCl ⁴⁹.

En estudios con dientes bovinos inoculados con *Streptococcus mutans* y *E. faecalis* ha demostrado la misma eficacia que el NaOCl al 2.5%, pero este es citotóxico y disminuye la actividad metabólica fibroblástica en ratones, no así el H₂O₃, que ha demostrado ser inocua para los tejidos ⁵⁰.

Todo lo anterior nos lleva por un camino en el que sitúa el H₂O₃ en un contexto vanguardista y prometedor, y cada vez la literatura toma más peso validando científicamente sus propiedades antimicrobianas, y demostrando que es inocua para los tejidos.

6.3 Aceite Ozonizado

Ha demostrado ser eficaz contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* y especialmente *Micobacterias* ⁴⁷.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el efecto antimicrobiano coadyuvante del agua ozonizada utilizada dentro de un protocolo de irrigación preestablecido con hipoclorito de sodio al 1% y suero fisiológico, en conductos de dientes humanos inoculados con microbiota.

Objetivos específicos:

I. Comparar la presencia de colonias bacterianas en raíces dentarias inoculadas con microbiota, antes de la aplicación de cuatro protocolos de irrigación diferentes (hipoclorito de sodio 1%, hipoclorito de sodio 5.25%, agua ozonizada más hipoclorito de sodio 1%, suero fisiológico)

II. Comparar la presencia de colonias bacterianas en raíces dentarias inoculadas con microbiota, después de la aplicación de cuatro protocolos de irrigación diferentes (hipoclorito de sodio 1%, hipoclorito de sodio 5.25%, agua ozonizada más hipoclorito de sodio 1%, suero fisiológico)

III. Describir las bacterias más prevalente en la microbiota antes y después de los protocolos de irrigación.

IV. HIPÓTESIS

El protocolo de irrigación con hipoclorito de sodio al 1% más agua ozonizada tiene una capacidad bactericida mayor o igual al protocolo de irrigación con hipoclorito de sodio al 1% en conductos dentarios inoculados con microbiota.

V. DISEÑO METODOLÓGICO

1. Muestra y universo

1.1 Diseño de estudio

Estudio experimental in vitro en paralelo con doble ciego y grupo control.

1.2 Definición de universo

Se constituirá por la microbiota característica de la pulpa con necrosis séptica parcial.

1.3 Determinación del tamaño muestral

Nuestra investigación corresponde a un estudio para contraste de hipótesis unilateral. Determinamos el tamaño muestral basándonos en el estudio de Alamo and cols⁵⁰. Se utilizara una desviación estándar de 210,9, además un valor mínimo de disminución de UFC de 300. Se consideró un nivel de confianza del 95% (α : 0,05) y una potencia del 80% (β : 0,20).

El tamaño muestral quedara determinado a través de la siguiente fórmula:

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

Figura 7. Formula tamaño muestral para dos medias

Símbolo	Definición	Valor en estudio
n	Es el numero de sujetos necesarios para cada una de las muestras	X
Z α	Es el valor de Z correspondiente al riesgo α	1,645
Z β	Es el valor de Z correspondiente al riesgo β	0,842
S ²	Es la varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control	210,9 ²
d	Es el valor mínimo de la diferencia que se desea detectar	300

Tabla III. Componentes formula tamaño muestral

$$n = \frac{2(1,645 + 0,842)^2 \times 210,9^2}{300^2}$$

n = 6.113

Figura 8. Desarrollo formula tamaño muestral para dos medias

En conclusión tenemos que el tamaño muestral por cada grupo es de por lo menos 7 unidades de estudios.

1.4 Selección de muestra

1.4.1 Definición de muestra

La muestra se constituirá de la microbiota presente en una pulpa con necrosis séptica parcial extraída de una sola paciente, cumpliendo con los criterios de inclusión y exclusión.

1.4.2 Criterios de inclusión y de selección

- Pulpa con necrosis séptica parcial (reciente)
- Vía de infección cariogénica
- Con al menos 50 % de su constitución indemne
- Proveniente de un paciente adulto joven (18 a 30 años)
- Extraída de incisivos centrales superiores o caninos
- Diagnóstico de necrosis pulpar sin lesión apical

1.4.3 Criterios de exclusión

- Pulpa necrótica séptica
- Pulpa necrótica aséptica
- Vías de infección no cariogénica
- Con menos del 50% de su constitución indemne
- Proveniente de pacientes infantiles, adulto y adulto mayor
- Extraída de molares, premolares e incisivos centrales inferiores.
- Diagnostico de pulpa necrótica séptica con patologías apicales

2. Desarrollo del estudio

ETAPA 1: Recolección dentaria

Para la obtención de dientes se fijó un plazo entre los días primero y quince de diciembre del 2015.

Se obtuvieron solo de una odontóloga quien contaba con un stock de dientes humanos sanos que fueron extraídos por indicación de tratamiento ortodóncico durante el segundo semestre del año 2015. Cada paciente autorizó previamente a la odontóloga para utilizar sus dientes con fines académicos.

Una vez obtenidos fueron desinfectados y conservados refrigerados en el laboratorio de microbiología de la facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

El protocolo de desinfección⁵¹ utilizado consistió en eliminar los tejidos orgánicos con un cepillo de cerda dura y luego conservarlos en un frasco de vidrio con hipoclorito de sodio al 5.25%.

ETAPA 2: Selección dentaria

2.1 Corte coronario: el corte coronario fue realizado bajo refrigeración con una turbina y fresa cilíndrica extralarga número 8. Se cortó la corona dentaria a la altura necesaria de tal forma que cada raíz quedó con una longitud de 15 mm.



Figura 9. ETAPA 2.1 Corte coronario

2.2 Prueba Lima k#20: se introdujo la lima k#20 y se verificó que avanzara fácilmente hasta los 15 mm. Un total de 55 raíces cumplieron con este requisito y solo éstas se les tomaron radiografías.

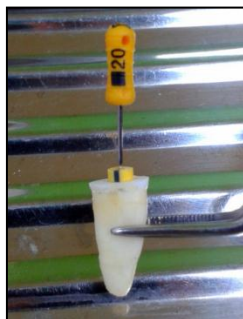


Figura 10. ETAPA 2.2 Prueba lima k#20

2.3 Radiografías con lima k#15: se montaron las raíces en un rodete de cera fijadas por el ápice cubriendo 1 cm de esta y permitiendo que se mantuvieran de manera vertical y estable por sí solas. Luego se enumeraron de manera arbitraria y se les tomaron radiografías periapicales ortorradales con una lima k#15 calibrada a 15 mm. Cada radiografía fue rotulada con el número de la raíz a la que pertenecía.



Figura 11. ETAPA 2.3 Preparación dentaria previa a radiografía

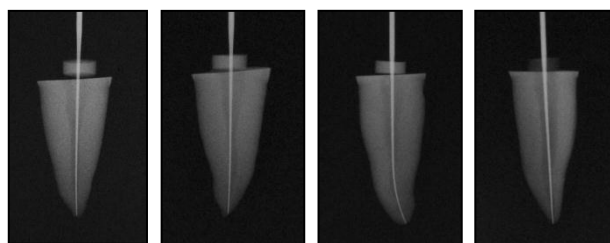


Figura 12 a 15. ETAPA 2.3 Radiografías con lima k#15 de raíces 1, 7, 15 y 24 respectivamente

Con estos tres procedimientos realizados se contó con la información necesaria para seleccionar las raíces que cumplieran con los criterios detallados en el Anexo 1.

ETAPA 3: Preparación dentaria

3.1 Montaje e identificación: cada raíz fue montada sobre una superficie cúbica de acrílico transparente de termopolimerización lo que permitió su esterilización en autoclave. Todas las raíces fueron identificadas con números del 1 al 28 de manera arbitraria con un plumón negro en la base del acrílico.



Figura16. ETAPA 3.1 Montaje e identificación

3.2 Instrumentación con sistema WaveOne™ lima large: cada raíz fue instrumentada según el protocolo propuesto por Densply (Anexo 2).



Figura 17 y 18. ETAPA 3.2 instrumentación con sistema WaveOne™

3.3 Esterilización y almacenamiento: las raíces fueron esterilizadas dentro de sobres de papel grado médico según las normas de bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso (Anexo 3). Una vez estériles cada sobre fue conservado en el laboratorio de nuestra facultad bajo las normas impuestas en el protocolo de esterilización antes mencionado.

ETAPA 4: Extracción pulpa necrótica

La obtención de la pulpa necrótica la realizó uno de los integrantes de nuestro grupo en las dependencias de la facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso dentro del horario de clínica integral, una vez que fueron ejecutadas las etapas anteriores.

La obtención del tejido pulpar se realizó en un campo de trabajo con aislamiento absoluto y utilizando una lima endodóntica basándonos en el método propuesto por Huang en el año 2009⁵².

Una vez que fue extraída la pulpa se depositó el vástago de la lima, cortado con una tijera estéril, en un tubo de ensayo con 3 ml de caldo de cultivo cerebro corazón (BHI), el cual fue incubado por 24 horas a 37°C en aerobiosis en el laboratorio de nuestra facultad, donde se llevaron a cabo todas las etapas posteriores. Este cultivo fue nombrado cultivo madre (C.M).

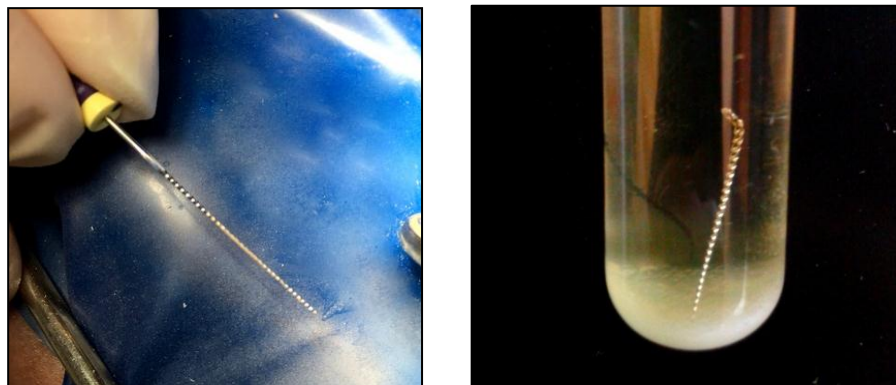


Figura 19 y 20. ETAPA 4 Extracción pulpa necrótica y cultivo madre

ETAPA 5: Recuento bacteriano y frotis del cultivo madre

Una vez que transcurrieron las 24 horas se llevó a cabo el procedimiento que consistió en las siguientes etapas:

5.1 Recuento bacteriano del cultivo madre: se utilizó el método del número más probable y conteo bacteriano de UFC con el contador de Quebec.

Se dispuso del cultivo madre más cuatro tubos de ensayo con 9 ml de suero fisiológico cada uno, rotulados con las siglas C.M 10¹, C.M 10², C.M 10³ y C.M 10⁴, más cuatro placas petri de 10 cm de diámetro con agar cerebro corazón, una para cada tubo rotuladas de igual manera.

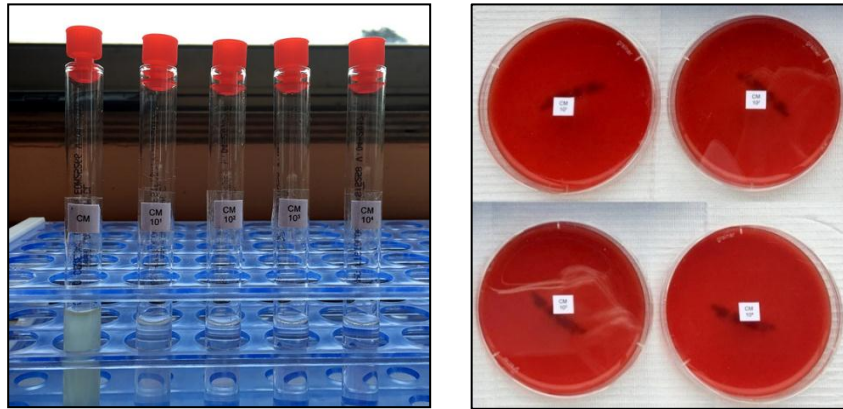


Figura 21 a 22. ETAPA 5.1 Método del número más probable, C.M, dilución y placas petri

Con una pipeta estéril se extrajo 1 ml de cultivo madre y se diluyó en el tubo C.M 10^1 , con otra pipeta estéril se extrajo 1 ml del tubo C.M 10^1 y se diluyó en el tubo C.M 10^2 , luego con otra pipeta estéril se extrajo 1 ml del tubo C.M 10^2 y se diluyó en el tubo C.M 10^3 , con otra pipeta estéril se extrajo 1 ml del tubo C.M 10^3 y se diluyó en el tubo C.M 10^4 , y finalmente con otra pipeta estéril se extrajo 1 ml del tubo C.M 10^4 y se desechó en un frasco de vidrio con hipoclorito al 5%. Todos los tubos fueron sellados.

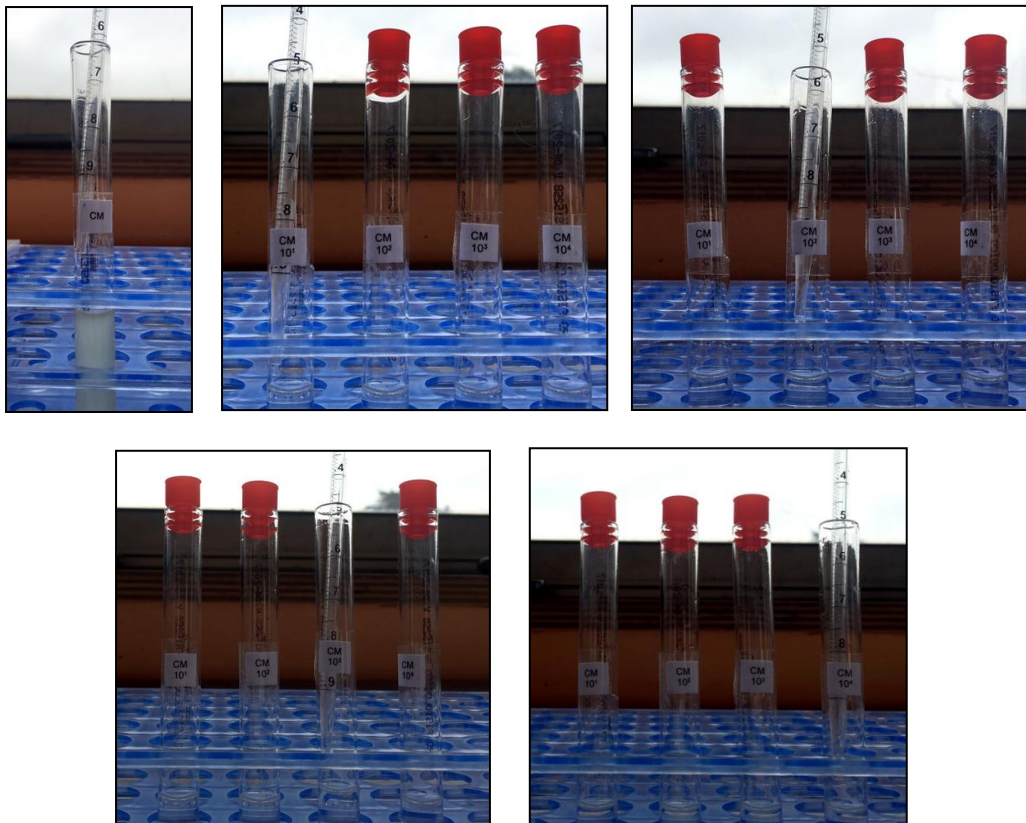


Figura 23 a 27. ETAPA 5.1 Método del número más probable (Izquierda a derecha)

Posteriormente con una pipeta se extrajo 0,1 ml del tubo C.M 10^1 se depositó en la placa petri rotulada C.M 10^1 y se distribuyó homogéneamente en toda su amplitud con un tubo capilar doblado y estéril, el mismo procedimiento se realizó con los tubos y placas petri C.M 10^2 , C.M 10^3 y C.M 10^4 respectivamente.

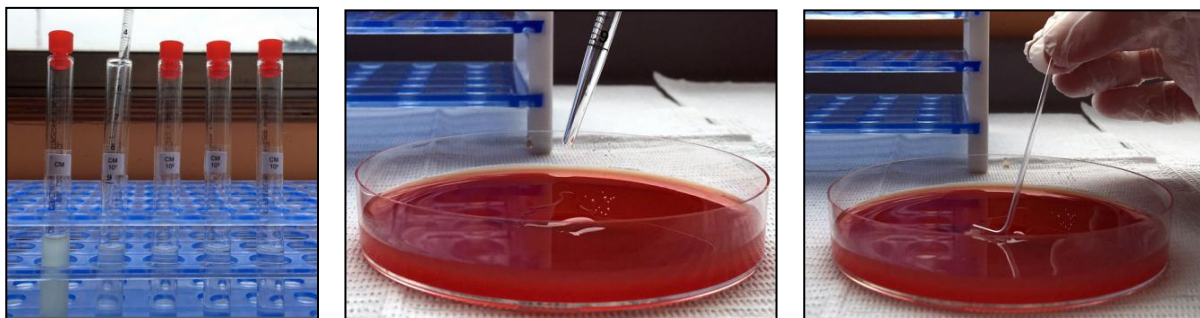


Figura 28 a 30. ETAPA 5.1 Método del número más probable

Para finalizar todas las placas Petri fueron cultivadas por 24 horas a 37°C en aerobiosis, y luego de esto se realizó el conteo de UFC utilizando el contador de Quebec.

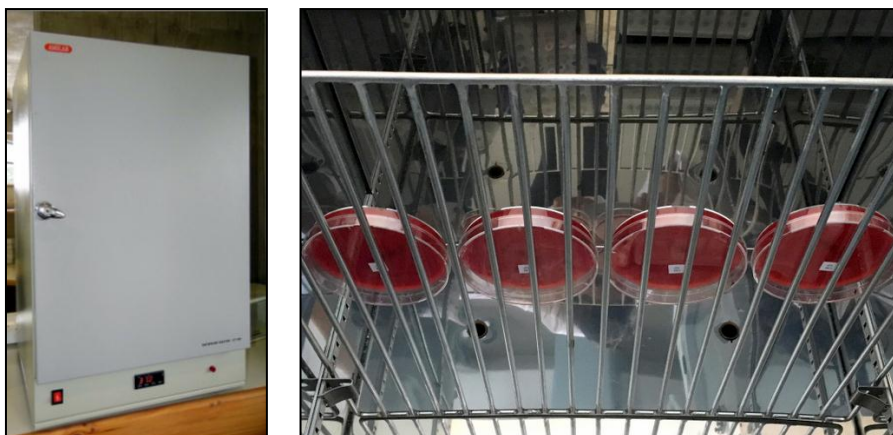


Figura 31 y 32. ETAPA 5.1 Cultivo de placas petri en estufa de cultivo



Figura 33 a 35. ETAPA 5.1 Placa petri luego de 24 hrs y conteo de UFC utilizando el contador de Quebec.

5.2 Frotis del cultivo madre: se realizo un frotis del cultivo madre. Para lo cual se extendió 0,3 ml de cada tubo con una pipeta colocándola directamente sobre el portaobjetos. Luego se fijó la muestra dejándola por tres horas en la estufa de cultivo a 37°C conservándola en una caja de metal sellada y a temperatura ambiente.



Figura 36. ETAPA 5.2 Frotis del cultivo madre

ETAPA 6: Inoculación dentaria con cultivo madre

Cada raíz se inoculó con 0,1 ml de cultivo madre y se selló con cemento temporal sin eugenol (Coltosol® F), luego se cultivaron por 24 horas a 37°C en aerobiosis.

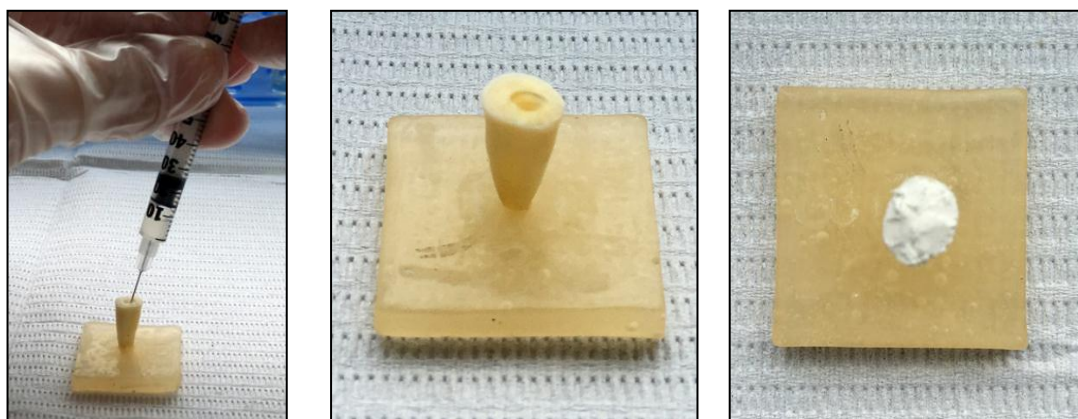


Figura 37 a 39. ETAPA 6 Inoculación dentaria con cultivo madre

ETAPA 7: División aleatoria de raíces y formación de grupos de estudio

Se utilizó el programa Epidat 3.0 para generar la distribución aleatoria de las muestras ya inoculadas. Se formaron cuatro grupos (A, B, C y D) cada uno con 7 raíces numeradas. Cada raíz fue rotulada con la sigla compuesta XY donde X correspondió a la letra de su grupo e Y al número de la raíz, por ejemplo, si la raíz 1 por aleatorización quedo en el grupo A, fue llamada A1.

Grupo de estudio	Raíces
A	1, 3, 28, 25, 5, 13, 21
B	2, 20, 22, 12, 18, 10, 7
C	5, 16, 23, 14, 26, 19, 24
D	4, 8, 15, 11, 9, 17, 27

Tabla IV. Grupos de estudio

ETAPA 8: Obtención, recuento de colonias bacterianas y frotis de cultivos iniciales

Se realizó el procedimiento, de manera aséptica, a partir de cada raíz de los cuatro grupos cultivados a 37°C por 24 horas desde su inoculación.

8.1 Obtención de los cultivos iniciales: una vez que terminó el proceso de inoculación y cultivo de las raíces, se eliminó el sello de cemento, se introdujo un cono de papel #40 y se dejó por 5 minutos basándose en el trabajo realizado por Ihsan⁵³ el año 2014. Posteriormente se introdujo el cono en un tubo de ensayo con 3 ml de BHI que fue rotulado como cultivo inicial más la sigla del grupo y número de cada raíz (CIA1, CIA3, etc). Cada cultivo inicial fue cultivado por 24 horas a 37°C en aerobiosis. Posteriormente con una jeringa se le inyectaron 0,1 ml de BHI a cada raíz y fueron nuevamente selladas con cemento temporal libre de eugenol y cultivadas por 24 horas a 37°C en aerobiosis, para luego obtener el cultivo final a partir de cada una.

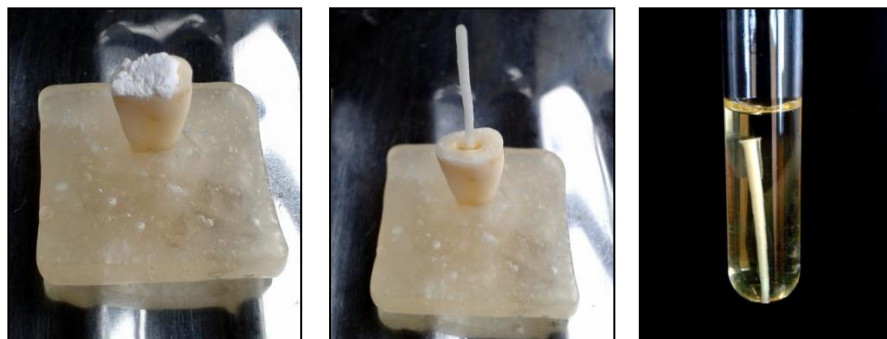


Figura 40 a 42. ETAPA 8.1 Obtención cultivo inicial



Figura 43 y 44. ETAPA 8.1 Cultivo de raíces para luego obtener el cultivo final a partir de ellas.

8.2 Recuento bacteriano y frotis de los cultivos iniciales: Una vez que transcurrieron las 24 horas se realizó el recuento de colonias del cultivo inicial con el método del número más probable, el conteo bacteriano de UFC con el contador de Quebec y además frotis de un cultivo inicial por grupo de estudio (todas las técnicas fueron descritas en la etapa 6). Los Cultivos iniciales seleccionados arbitrariamente para los frotis fueron CIA1, CIB2, CIC5 y CID4.

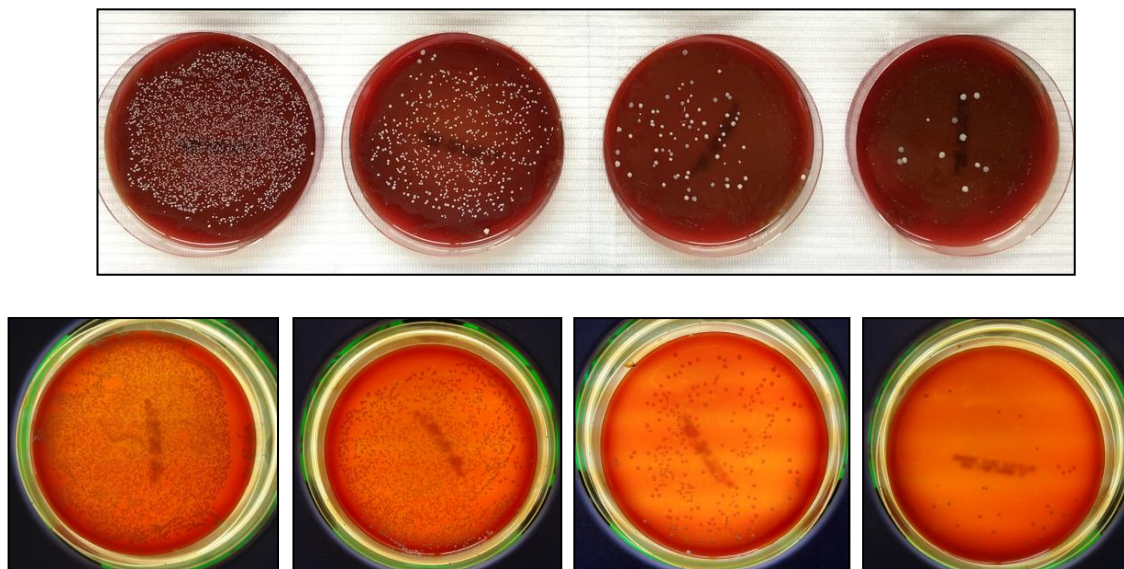


Figura 45 a 49. ETAPA 8.2 Placas petri (sup) y conteo bacteriano en contador de Quebec (Inf) del CIA1

ETAPA 9: Irrigación

Una vez transcurridas las 24 horas de cultivo de las raíces, se eliminó el sello de cemento y se realizó el protocolo de irrigación asignado para cada grupo.

Un solo integrante realizó esta etapa y se encontró en total desconocimiento de qué protocolo de irrigación aplicó a cada grupo.

Se utilizó el programa Epidat 3.0, el cual de manera aleatoria nos indicó el color que diferenció y representó la secuencia de irrigantes utilizada, este color se puso en las jeringas de cada grupo de estudio.

El experimento contó con cuatro secuencias de irrigación diferentes, todas con 6 pasos lo que permitió su estandarización, cada paso se realizó en 1 minuto.

Se contó con 6 jeringas por grupo y estas se rellenaron con la secuencia de irrigación correspondiente. El integrante que cargó las jeringas e irrigó nunca supo el contenido de cada una de estas.

G.E.	Raíces	Color	Secuencia de Irrigación
A	1, 3, 28, 25, 5, 13, 21	Rojo	1-Hipoclorito 1% 2-Hipoclorito 1% 3-Hipoclorito 1% 4-Hipoclorito 1% 5-Hipoclorito 1% 6-Suero Fisiológico
B	2,20, 22, 12, 18, 10, 7	Verde	1-Hipoclorito 1% 2-Hipoclorito 1% 3-Agua ozonizada 120ug/ml 4-Agua ozonizada 120ug/ml 5-Agua ozonizada 120ug/ml 6-Suero fisiológico
C	5, 16, 23, 14, 26, 19, 24	Amarillo	1-Hipoclorito 5.25% 2- Hipoclorito 5.25% 3- Hipoclorito 5.25% 4- Hipoclorito 5.25% 5- Hipoclorito 5.25% 6-Suero fisiológico
D	4, 8, 15, 11, 9, 17, 27	Azul	Suero fisiológico x 6

Tabla V. Grupos de estudios y secuencias de irrigación

ETAPA 10: Obtención, recuento de colonias bacterianas y frotis de cultivos finales

10.1 Obtención de cultivos finales: Una vez terminado el proceso de irrigación de las raíces se introdujo un cono de papel #40 y se dejó por 5 minutos basándose en el trabajo realizado por Ihsan⁵³. Posteriormente se introdujo el cono en un tubo de ensayo con 3 ml de BHI que fue rotulado como cultivo final más la sigla del grupo y número de cada raíz (CFA1, CFA3, etc). Cada cultivo final fue cultivado por 24 horas a 37°C en aerobiosis.

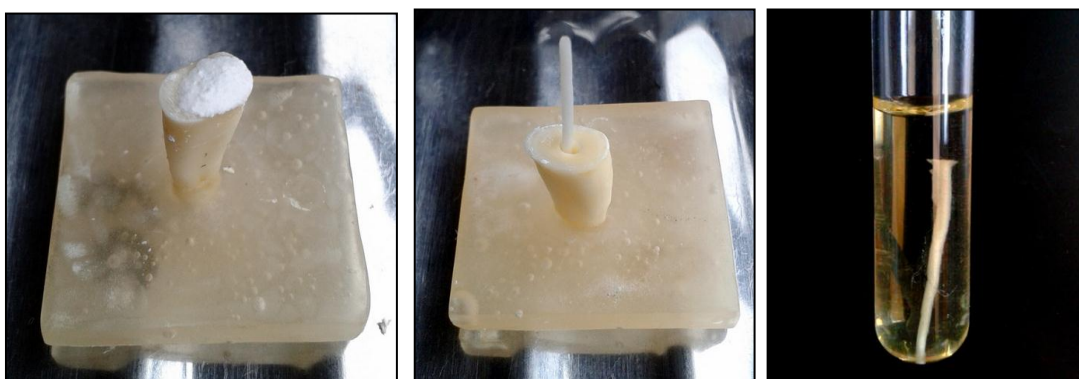


Figura 50 a 52. ETAPA 10.1 Obtención cultivo final

10.2 Recuento de colonias y frotis de los cultivos finales: Una vez que transcurrieron las 24 horas se realizó el recuento de colonias del cultivo final con el método del número más probable, el conteo bacteriano de UFC con el contador de Quebec y además frotis de un cultivo final por grupo de estudio (todas las técnicas fueron descritas en la etapa 6). Los Cultivos finales seleccionados arbitrariamente para los frotis fueron CFA1, CFB2, CFC5, y CFD4.

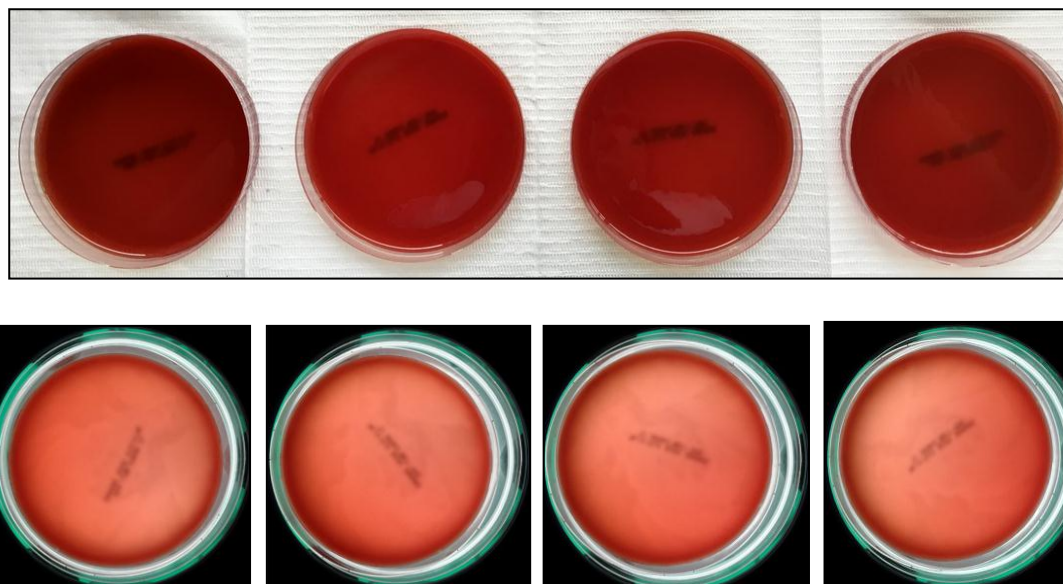


Figura 53 a 57. ETAPA 10.2 Placas petri (sup) y conteo bacteriano en contador de Quebec (Inf) del CFA1

ETAPA 11: Identificación Bacteriana

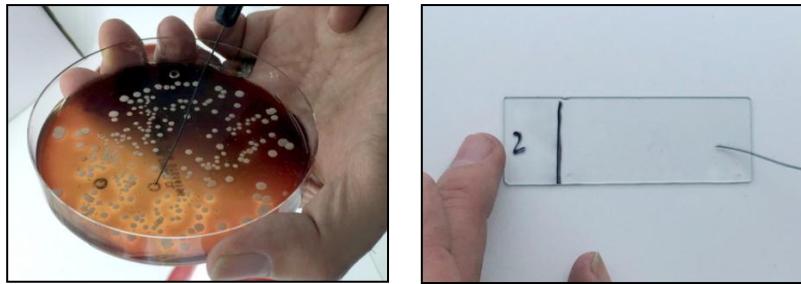
11.1 Pruebas de identificación microscópica del cultivo madre, cultivos iniciales, cultivos finales y colonias bacterianas representativas: se seleccionaron frotis del cultivo madre y provenientes de un cultivo inicial y otra de un cultivo final de los cuatro grupos de irrigación (CM, CIA1, CIB2, CIC5, CID4, CFA1, CFB2, CFC5, CFD4).

Además se utilizaron dos placas petri, una del cultivo madre (C.M 10^2) y una del grupo control (CFD4 10^2).

De estas placas se eligieron tres unidades formadoras de colonias representativas para su identificación: una colonia blanca (UFC1), una transparente (UFC2) y una pequeña con halo hemolítico (UFC3). Se le aplicaron diversas pruebas de laboratorio con dos objetivos. El primero demostrar que las bacterias presentes en la pulpa necrótica son las mismas encontradas en el cultivo del grupo control que fue irrigado solo con suero fisiológico y descartar una contaminación involuntaria durante el tratamiento, y el segundo objetivo fue tratar de dilucidar el tipo de bacterias encontradas en los cultivos con la aplicación de pruebas de identificación microscópica, pruebas de identificación bioquímicas y pruebas de identificación basadas en la resistencia a ciertas sustancias.



Figuras 58 y 59. Placa CM y Placa GC respectivamente, selección de colonias representativas



Figuras 60 y 61. ETAPA 11.1 Selección y frotis de colonias bacterianas representativas

Se realizó tinción Gram a los frotis del cultivo madre, cultivos iniciales, cultivos finales y las tres colonias bacterianas representativas. Posteriormente se observaron con el microscopio óptico con lente de inmersión (100x).

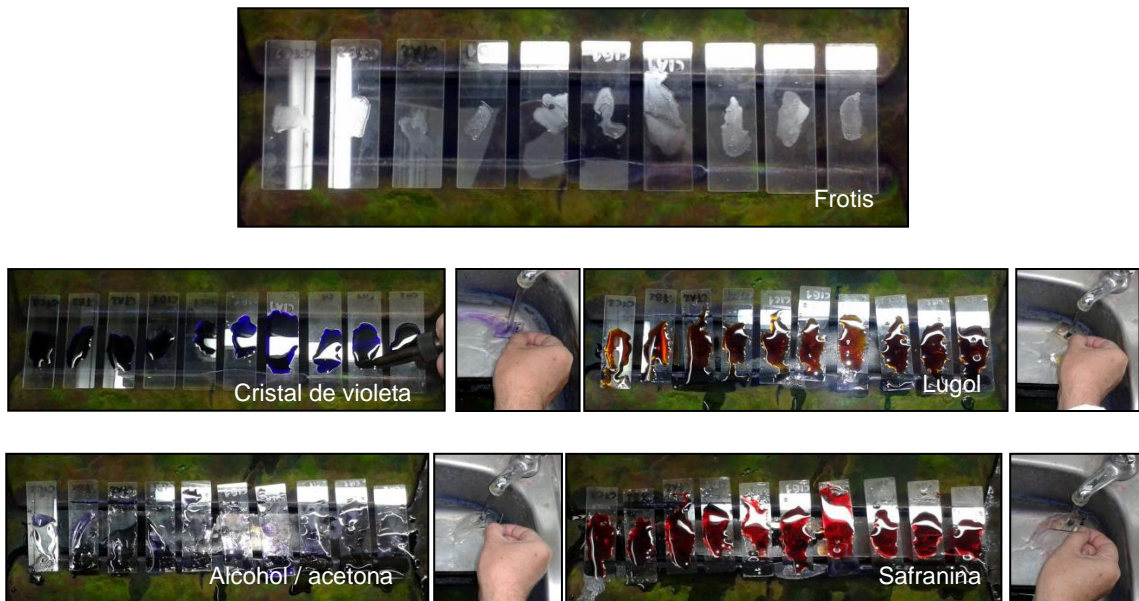


Figura 62 a 70. ETAPA 11.1 Secuencia de Tinción Gram (arriba abajo y de izquierda a derecha)

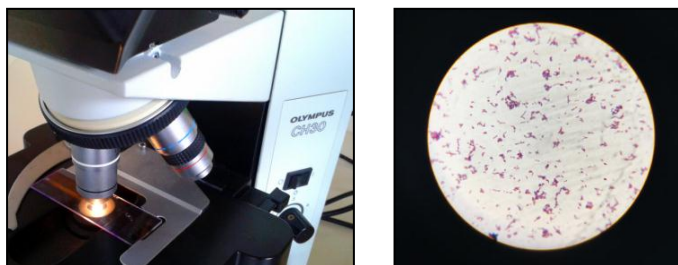


Figura 71 y 72. ETAPA 11.1 Observación microscópica (100x) de Frotis

11.2 Pruebas de Identificación bioquímicas: se aplicaron un total de cuatro pruebas de identificación bioquímica: de Catalasa, Coagulasa, Bilis Esculina y ADNasa.

Nos basamos en sus características macroscópicas para guiarnos en qué tipo de pruebas realizar a cada colonia. A todas las colonias se les realizó la prueba de la catalasa, a las UFC1 se les realizaron además las pruebas de Coagulasa y ADNasa, y a las UFC2 también se les aplico la prueba de bilis esculina.



Figura 73 a 76. ETAPA 11.2 Prueba de identificación bioquímica Catalasa, Coagulasa, ADNasa y Bilis esculina respectivamente.

11.3 Pruebas de Identificación basadas en la resistencia a ciertas sustancias: Se realizó esta prueba a las UFC2.

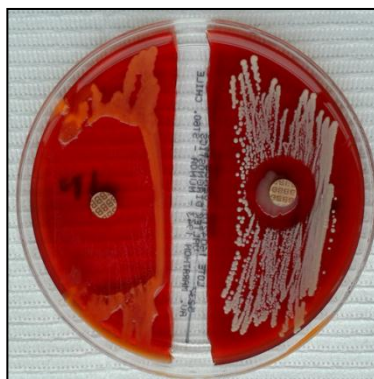


Figura 77. ETAPA 11.3 Prueba de identificación basada en resistencia a Bacitracina

VI. RECOLECCIÓN DE DATOS

1. Variables estadísticas

Variables	Tipo	Dimensión	Escala	Indicador
Protocolo de irrigación	Independiente	Cualitativa	Nominal	Verde/Rojo/Azul/Amarillo
Poder bactericida	Dependiente	Cuantitativa	Discreta	Conteo por dilución (UFC)
Concentración del irrigante	Independiente	Cuantitativa	Continua	% v/v
Forma del conducto	Independiente	Cualitativa	Nominal	Redondo Oval Irregular
Recuento bacterianos del cultivo madre	Independiente	Cuantitativa	Discreta	Conteo por dilución (UFC)
Recuento bacteriano de cultivos iniciales	Dependiente	Cuantitativa	Discreta	Conteo por dilución (UFC)
Recuento bacteriano de cultivos finales	Dependiente	Cuantitativa	Discreta	Conteo por dilución (UFC)
Identificación bacteriana de cultivo madre	Independiente	Cualitativa	Nominal	Tinción Gram (+/-) Pruebas bioquímicas (+/-) Pruebas de resistencia (resistente/sensible)
Identificación bacteriana de cultivos iniciales	Dependiente	Cualitativa	Nominal	Tinción Gram (+/-) Pruebas bioquímicas (+/-) Pruebas de resistencia (resistente/sensible)
Identificación bacteriana de cultivos finales	Dependiente	Cualitativa	Nominal	Tinción Gram (+/-) Pruebas bioquímicas (+/-) Pruebas de resistencia (resistente/sensible)

Tabla VI. Variables estadísticas

2. Definiciones conceptuales y operacionales

Variables	Definición conceptual	Definición operacional
Protocolo de irrigación	Técnica y secuencia predeterminada de irrigación con un compuesto activo en concentración estable, aplicada en un determinado volumen por una cantidad de tiempo definido.	Secuencia de irrigantes utilizados en cada grupo (A, B, C, y D) durante el experimento, La secuencia A esta compuesta por hipoclorito y suero fisiológico al 1% La secuencia B está compuesta por hipoclorito al 1%, agua ozonizada y suero fisiológico. La secuencia C está compuesta por hipoclorito al 5,25% y suero fisiológico. La secuencia D está compuesta solo por suero fisiológico.
Poder bactericida	Capacidad de producir muerte bacteriana, se determina calculando la cantidad mínima de dicha sustancia capaz de producir la muerte de una suspensión patrón en un tiempo determinado.	Remoción efectiva de la biopelícula bacteriana por parte de la secuencia de irrigante utilizada, reflejada en la diferencia del conteo de UFC del cultivo inicial con el final
Concentración del irrigante	Proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolvente.	Volumen de soluto por cada cien unidades de volumen del irrigante, en el estudio utilizaremos el porcentaje representado por el compuesto activo en el volumen total de la disolución irrigante expresado en % v/v.
Forma del conducto	Configuración externa de algo.	Configuración externa del conducto radicular en un corte transversal.
Recuento bacterianos del cultivo madre	Valor cuantitativo de una población bacteriana	Conteo de UFC en cada placa Petri cultivada con el cultivo madre.
Recuento bacteriano de cultivos iniciales	Valor cuantitativo de una población bacteriana	Conteo de UFC en cada raíz cultivada con el cultivo madre.
Recuento bacteriano de cultivos finales	Valor cuantitativo de una población bacteriana	Conteo de UFC en cada raíz cultivada con el cultivo madre después de haber sido previamente cuantificada y sometida al proceso de irrigación.

Identificación bacteriana de cultivo madre	Ejercicio de pruebas de laboratorio que determinan género y especie de un microorganismo.	Observación macroscópica y microscópica y aplicación de pruebas bioquímica y de resistencia de los microorganismos del cultivo madre registrados en tabla de resultados Excel.
Identificación bacteriana de cultivos iniciales	Ejercicio de pruebas de laboratorio que determinan género y especie de un microorganismo	Observación macroscópica y microscópica y aplicación de pruebas bioquímica y de resistencia de los microorganismos de los cultivos iniciales registrados en tabla de resultados Excel.
Identificación bacteriana de cultivos finales	Ejercicio de pruebas de laboratorio que determinan género y especie de un microorganismo	Observación macroscópica y microscópica y aplicación de pruebas bioquímica y de resistencia de los microorganismos de los cultivos finales registrados en tabla de resultados Excel.

Tabla VII. Definiciones conceptuales y operacionales de las variables estadísticas

3. Instrumentos o índices

Se utilizó el método de dilución del número más probable y frotis especificados anteriormente en el desarrollo del estudio, consignados como conteo bacteriano por unidades formadoras de colonias y morfología por tinción gram, pruebas bioquímicas y de resistencia.

4. Informe de deserciones y duración del estudio

No existieron pérdidas ni deterioro de ninguna de las muestras.

En su totalidad el estudio se extendió por 9 meses, iniciando en octubre del 2015 y finalizando en julio del 2016. A continuación se detallarán las etapas realizadas en cada periodo:

Curso	Meses	Etapas del estudio
Tesis I	Octubre - Diciembre	Elaboración de marco teórico y diseño de metodología.
Tesis II	Marzo	Correcciones Proyecto de Tesis
	Marzo – Mayo	Desarrollo del experimento y obtención de resultados
	Junio - Julio	Análisis de resultados Discusión Conclusión

Tabla VIII. Duración del estudio, Etapas del estudio por periodo de tiempo

5. Aprobación por comité de ética y bioseguridad

No fue necesario solicitar la aprobación del comité de ética por tratarse de un estudio in vitro, solo se aplicó un consentimiento informado (Anexo 4) que fue explicado y firmado por el paciente donador de la pulpa necrótica.

Además se siguieron las normas de bioseguridad estipuladas por la universidad para el manejo de desechos biológicos y manejo de microorganismos patógenos (Anexo 3).

Cabe mencionar que para el desarrollo del estudio fue necesario realizar los siguientes trámites administrativos:

- Solicitud al comité de bioseguridad
- Solicitud de uso del laboratorio de investigación.

Requerimientos para el uso del laboratorio de investigación:

- Inscripción vía plataforma virtual de los días de uso del equipo requerido
- Entrenamiento del uso de los equipos requeridos y calibración
- Cumplir con las normas de seguridad, tales como uso lentes de protección, delantal blanco y gorro.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1. Tipo de estudio estadístico

Estudio experimental in vitro en paralelo con doble ciego y grupo control

2. Test a utilizar y programa estadístico

Primero fue necesario verificar la homogeneidad de las varianzas en los cultivos iniciales de cada grupo de estudio. Para este fin utilizamos el programa Stata 13.0, el cuál automáticamente aplico tres pruebas estadísticas para el análisis de las varianzas, dentro de ellas la Prueba de Levene, su alternativa que reemplaza la media por mediana y su otra alternativa que sustituye la media con el 10% de la media truncada.

El resultado obtenido fue de $p > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula de igualdad de las varianzas, concluyendo que los cuatro grupos de estudio poseen homogeneidad.

Para determinar qué tipo de análisis estadístico utilizar, si paramétrico o no paramétrico, antes se debió determinar la distribución y homocedasticidad en los grupos de hipoclorito 1% y suero fisiológico. En vista de que el resultado fue de una disminución absoluta para el grupo de hipoclorito al 5.25% y el de hipoclorito 1% más agua ozonizada, ambos no fueron considerados.

Se aplico el Test de Barlet, lo que indico que existía homocedasticidad y luego se aplico el Test de Shapiro-Wilk W que indico una distribución normal, tanto en el grupo de Hipoclorito 1% como en el de suero fisiológico.

Por lo que el análisis estadístico que correspondería utilizar es para métrico, específicamente la Prueba T, debido a que el estudio cuenta con una muestra inferior a 30, se tuvo que aplicar la alternativa no paramétrica el Test de Wilcoxon.

El resultado de este ultimo indico que existía una disminución estadísticamente significativa en el grupo del hipoclorito 1% y un aumento estadísticamente significativo en el grupo del suero fisiológico.

Por último para demostrar que existe una diferencia estadísticamente significativa en la eficacia bactericida del hipoclorito al 1% más agua ozonizada y del hipoclorito al 1% se aplico la prueba de Pr test lo que resulto en su confirmación.

Los análisis estadísticos y gráficos fueron desarrollados en el software estadístico Stata 13.0.

VIII. RESULTADOS

1. Pruebas cuantitativas:

Se realizaron los conteos de UFC, mediante el método del número más probable, se escogió la placa de cultivo con la dilución correspondiente a 10^4 de cada raíz en cada grupo de estudio. Esto se realizó antes para las UFC iniciales y después para las UFC finales de cada protocolo de irrigación, los resultados se expresan en la siguiente tabla:

Grupo		Raíces	UFC Inicial	UFC Final
A	NaOCl 1%	A1	46800000	28000000
		A3	55800000	22300000
		A28	32500000	9100000
		A25	35600000	12400000
		A5	26700000	7200000
		A13	11700000	3500000
		A21	46800000	15400000
B	NaOCl 1% más H ₂ O ₃	B2	42400000	0
		B20	42400000	0
		B22	35200000	0
		B12	43200000	0
		B18	46400000	0
		B10	24600000	0
		B7	51200000	0
C	NaOCl 5,25%	C5	38400000	0
		C16	5440000	0
		C23	72800000	0
		C14	41600000	0
		C26	74400000	0
		C19	70400000	0
		C24	65600000	0
D	Suero fisiológico	D4	21600000	92800000
		D8	13800000	76800000
		D15	54000000	93600000
		D11	57600000	71200000
		D9	30200000	94400000
		D17	29400000	97600000
		D27	54400000	88000000

Tabla IX. Resultados de recuento UFC antes y después del protocolo de irrigación

En la tabla se observa que tanto en el grupo B como en el grupo C no existió crecimiento bacteriano a las 24 horas después de aplicado el protocolo de irrigación. Mientras que en los grupos A y D sí se contabilizó UFC luego de aplicado el protocolo correspondiente a cada grupo, siendo el grupo D el que presentó mayor número de UFC.

Se realizó el análisis de homogeneidad de las varianzas entre los grupos de los cultivos iniciales mediante el uso de tres pruebas estadísticas; primero el test de Levene (W_0), segundo otra test que reemplaza las medias por la mediana (W_{50}), y por último otra alternativa que sustituye a la media con el 10% de media truncada (W_{10}). Se procesaron los datos y los resultados fueron los siguientes para el p valor en cada test:

- $W_0 = 0.298$
- $W_{50} = 0.743$
- $W_{10} = 0.298$

En los tres test el p valor obtenido es mayor a 0.05, esto quiere decir que las varianzas son homogéneas para los tres grupos, por lo tanto las muestras son similares entre sí.

Posteriormente se evaluó con gráficos de cajas y bigotes los resultados, comparando la reducción o aumento de las UFC en los distintos grupos, teniendo en cuenta que el resultado fue absoluto para los grupos de NaOCl 1% más H_2O_3 y el grupo de NaOCl 5.25%, y que no se consideró el grupo de suero fisiológico por ser grupo control.

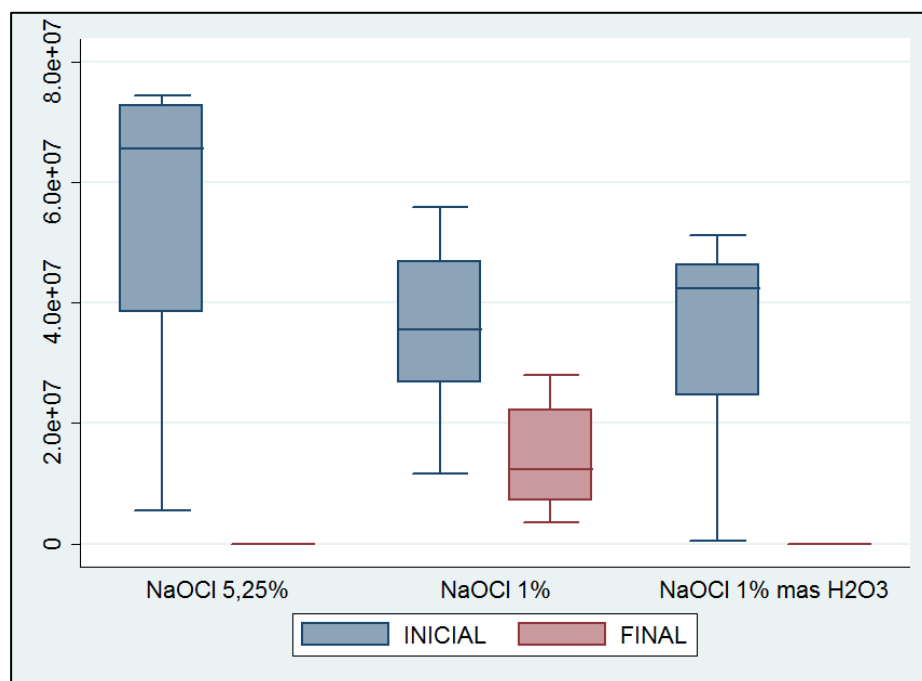


Figura 78. Comparación de los protocolos de irrigación mediante el conteo de unidades formadoras de colonias inicial y final.

El gráfico 1 de cajas y bigotes nos entrega la siguiente información:

- En los grupos NaOCl 5,25% y NaOCl 1% más H₂O₃, se observa una disminución absoluta, por lo que nos entrega una efectividad del 100% para ambos grupos.
- En el grupo del NaOCl al 1% se observa una disminución de las UFC finales con respecto a las iniciales, la cual no es absoluta.

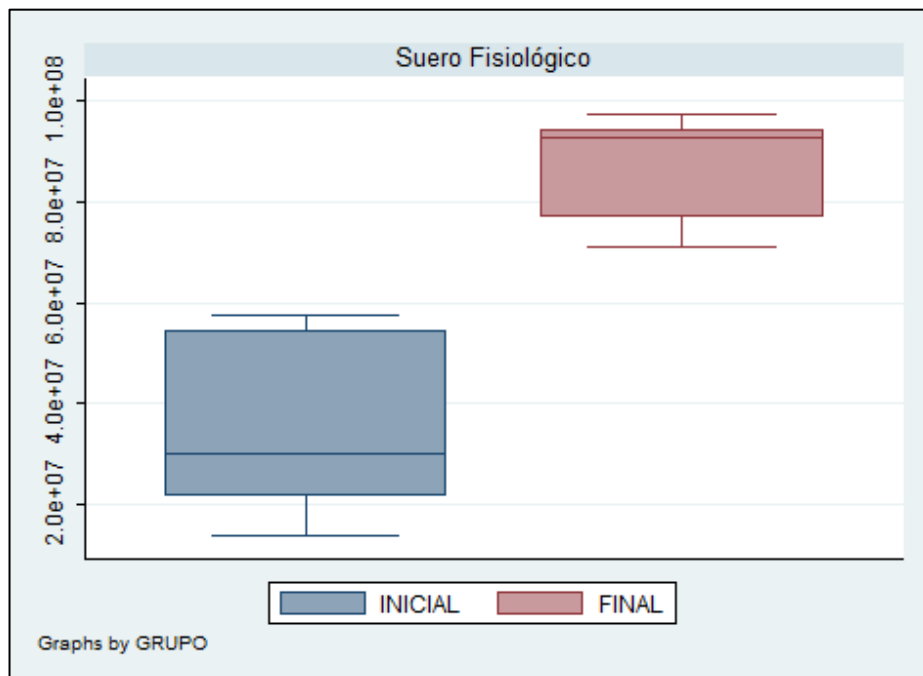


Figura 79. Gráfico de unidades formadoras de colonias del grupo control irrigado con suero.

El gráfico 2 de cajas y bigotes nos entrega la siguiente información:

- Se observa un aumento en las UFC entre el conteo inicial y final.

Considerando que los resultados del grupo NaOCl 5.25% y del grupo NaOCl 1% más H₂O₃ fueron absolutos, con efectividad del 100%, solo se procedió a analizar la media (M), desviación estándar (DE), P valor para Test de Barlett (homocedasticidad) y P valor para test de Shapiro-Wilk W (normalidad) para los grupos que tuvieron efectividad bactericida menor a 100%, que corresponden a NaOCl 1% y suero fisiológico. Para saber si las diferencias entre el conteo de las UFC iniciales y finales son estadísticamente significativas se utilizó la prueba paramétrica T y su alternativa no paramétrica prueba Wilcoxon, debido a que el tamaño muestral es inferior a 30.

Grupo		UFC	M	DE	P valor para Test de Barlett	P valor Test Shapiro-Wilk W	P valor para Prueba T	P valor para Prueba Wilcoxon
A	NaOCl 1%	Inicial	3.66e+07	1.48e+07	0.21	0.68965	0.023	0.0180
		Final	1.40e+07	8659374				
D	Suero	Inicial	3.73e+07	1.78e+07	0.1843	0.19056	0	0.0180
		Final	8.78e+07	9956859				

Tabla X. Parámetros estadísticos y test aplicados con un nivel de significancia de 0.05 para los grupos NaOCl 1% y suero fisiológico

Se concluye con esta tabla que ambos grupos presentan una distribución normal y homocedasticidad.

Para la prueba T, tanto en el grupo NaOCl 1% como en el grupo de suero fisiológico se obtiene un p valor < a 0.05, por lo tanto la disminución de unidades formadoras de colonias en el grupo del hipoclorito de sodio al 1% y el aumento de estas en el grupo del suero es estadísticamente significativo.

Para la alternativa no paramétrica se obtuvo que en ambos grupos el p valor fue distinto de cero, por lo que se puede afirmar que los deltas provienen de poblaciones distintas a cero, por lo tanto hay diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos.

Ya que la disminución del grupo del NaOCl al 1% fue estadísticamente significativa, es necesario determinar exactamente el porcentaje de disminución.

	UFC Inicial	UFC Final
Grupo NaOCl 1%	46800000	28000000
	55800000	22300000
	32500000	9100000
	35600000	12400000
	26700000	7200000
	11700000	3500000
	46800000	15400000
	Promedio inicial y final	36557142,9
Promedio	38,26	

Tabla XI. Porcentaje de disminución del grupo NaOCl al 1%

Por lo tanto el porcentaje de disminución de UFC finales con respecto a las iniciales es de 38,26, por lo tanto el hipoclorito de sodio al 1% es 61.74% efectivo, pero esto no se puede considerar estadísticamente significativo.

Se realiza Prtesti (test para igualdad de proporciones), obteniéndose como resultado un p valor de 0.0344, por lo tanto la diferencia entre los porcentajes de estos dos es estadísticamente significativa, lo que indica que el NaOCl 1% más H₂O₃ presenta una eficacia considerablemente mayor por lo que es mejor utilizar este protocolo que el otro.

2. Pruebas cualitativas:

2.1 Pruebas de identificación microscópica del cultivo madre, cultivos iniciales, cultivos finales y colonias bacterianas representativas

Se aplicó tinción Gram a los cultivos mencionados, posteriormente se observaron con el microscopio óptico con lente de inmersión, los resultados obtenidos fueron:

FROTIS	Cocos Gram +	Cocos Gram -	Bacilos Gram +	Bacilos Gram -
CM	✓	✓	✓	✓
CIA1	✓	✓	✓	✓
CIB2	✓	✓	✓	✓
CIC5	✓	✓	✓	✓
CID4	✓	✓	✓	✓
CFA1	✓	✓	✓	✓
CFB2	✗	✗	✗	✗
CFC5	✗	✗	✗	✗
CFD4	✓	✓	✓	✓
UFC1	✓	✓	✓	✓
UFC2	✓	✓	✓	✓
UFC3	✓	✓	✓	✓

Tabla XII. Resultados de Identificación microscópica

Se encontraron Cocos y Bacilos Gram+ y Gram- en todos los frotis a excepción de aquellos provenientes de los cultivos finales B y C (CFB2 y CFC5) que pertenecían al grupo de irrigación con hipoclorito de sodio 1% más agua ozonizada y al grupo de hipoclorito de sodio 5.25% respectivamente, donde no se observaron microorganismos.

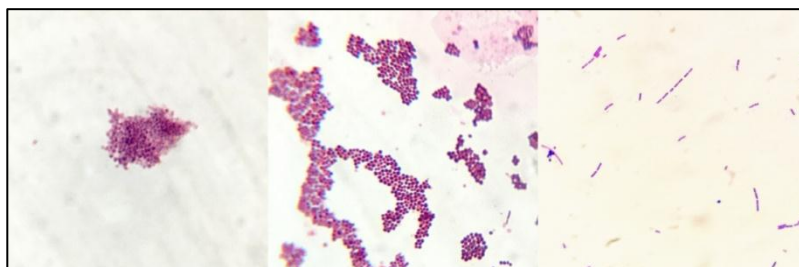


Figura 80. Imágenes Microscopio óptico 100x, Cocos y Bacilos Gram+

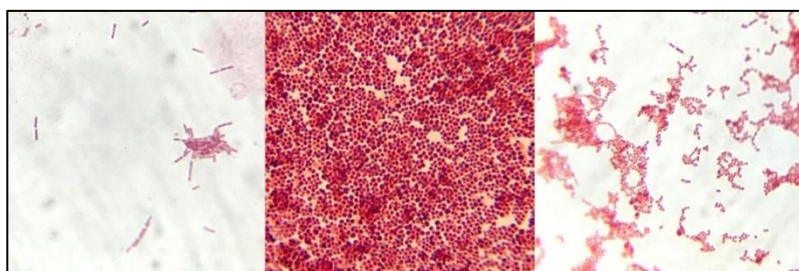


Figura 81. Imágenes Microscopio óptico 100x, Cocos y Bacilos Gram-

2.2 Pruebas de Identificación bioquímicas y de resistencia a ciertas sustancias

Se utilizaron dos placas Petri, una del cultivo madre (C.M 10^2) y una del grupo control (CFD4 10^2). Las UFC seleccionadas fueron: una colonia blanca (UFC1), una transparente (UFC2) y una pequeña con halo hemolítico (UFC3). Nos basamos en sus características macroscópicas para guiarnos en qué tipo de pruebas realizar a cada colonia. A todas las colonias se les realizó la prueba de la Catalasa, a las UFC1 se les realizó además las pruebas de Coagulasa y ADNasa, y a las UFC2 también se les aplicó la prueba de Bilis esculina. Finalmente se aplicó la prueba de resistencia a Bacitracina a la UFC2.

De la aplicación de estas pruebas se obtuvieron los siguientes resultados:

PRUEBAS	UFC1 CM	UFC2 CM	UFC3 CM	UFC1 GC	UFC2 GC	UFC3 GC
Catalasa	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Coagulasa	(-)			(-)		
ADNasa	(-)			(-)		
Bilis Esculina		(-)			(-)	
Bacitracina		Sensible			Sensible	

Tabla XIII. Pruebas de identificación bioquímicas y de resistencia. Cuadros sombreados indican que no se aplicó la prueba.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que hay altas probabilidades de que la UFC1 se trate de *S. epidermidis*, UFC2 *Streptococcus del grupo A* y UFC3 *Lactobacillus acidophilus*.

IX. DISCUSIÓN

Hallazgos principales

En el presente estudio se puso a prueba un protocolo de irrigación de hipoclorito de sodio al 1% y agua ozonizada con el fin de aminorar todos los efectos adversos que conlleva el uso de hipoclorito en altas concentraciones y a la vez aprovechando las características positivas que presenta el agua ozonizada para los tejidos vivos.

Al trabajar con microorganismos cultivados a partir de una muestra fidedigna de pulpa con necrosis séptica parcial abarcamos una microbiota diversa y representativa, el principal hallazgo de este estudio fue que el agua ozonizada actúa como un potenciador efectivo del hipoclorito de sodio al 1% ya que se obtuvo una capacidad bactericida de un 100%, nuestro estudio arrojó por lo tanto, resultados absolutos igualando la eficacia bactericida del gold estándar hipoclorito de sodio al 5,25%.

Por otro lado en los resultados cualitativos, los hallazgos de las pruebas microbiológicas aplicadas permiten inferir sobre los posibles tipos de bacterias más representativas que se encontraron en las UFC seleccionadas. Teniendo en cuenta estos resultados, y apoyándonos en la evidencia científica existente de la composición microbiológica endodóntica común, se presume que dentro de las tres UFC identificadas la primera correspondería a un Estafilococo Coagulasa Negativa y ADNasa negativa lo que podría indicar que es un Staphylococcus Epidermidis u otro, la segunda UFC se identificó como un Streptococcus del Grupo A por lo que podría ser un Streptococcus Pyogenes, y la tercera UFC indicó ser un Lactobacillus Gram +, por lo que podría tratarse de un Lactobacillus Acidophilus.

Validez Interna y Externa

Al ser este un estudio in vitro se contó con la posibilidad de controlar y estandarizar todo el procedimiento, evitando factores de confusión y posibles errores sistemáticos en su ejecución.

Se diseñó el experimento de tal forma que contara con doble ciego, el primer ciego correspondió a la aleatorización de las raíces para las formación de los grupos de estudio, y el segundo se encontró en el desconocimiento del contenido de las jeringas e igualando el número de pasos de cada protocolo de irrigación.

Para otorgar validez interna al estudio, un solo operador fue el encargado de realizar los procedimientos clave en la ejecución de la etapa experimental. Este previamente fue calibrado con un experto, el cuál fue considerado gold- estándar. Las etapas realizadas fueron el método de dilución del número más probable, el conteo bacteriano en el contador de Quebec (que además fue realizado bajo las mismas condiciones de iluminación y estratificación para la cuantificación) y la secuencia de irrigación de los protocolos.

En el tratamiento de la muestra se estandarizaron las condiciones eligiendo las raíces bajo criterios de selección bien definidos, de manera que sus diferencias fueron mínimas. Los medios de cultivo y crecimiento bacteriano utilizados fueron no selectivos y la manipulación de las muestras desde la obtención de la pulpa necrótica hasta los

posteriores cultivos fueron realizados bajo la normativa correspondiente y de forma aséptica.

Para contextualizarnos el estudio puede ser aplicado en otras poblaciones bacterianas in vitro y otros microorganismos aislados, por otro lado como no es posible emular las condiciones bucales no es de esperar que los resultados sean igual de efectivos, por último se debe destacar que en este estudio se trabajó con microorganismos representativos de una pulpa necrótica, exceptuando aquellos microorganismos anaerobios estrictos.

Interpretación de los resultados e implicancias clínicas

Coincide con los hallazgos de este estudio la eficacia bactericida del hipoclorito en altas concentraciones ya que al cuantificar las colonias bacterianas después del protocolo de irrigación con hipoclorito al 5,25% se encontró una cantidad nula de microorganismos. Si bien es cierto una solución al 5% es fuertemente bactericida, pero altamente tóxica; una solución al 0,5%, es menos irritante pero sus efectos antimicrobianos están disminuidos^{25,29,30}. Coincidente a esto último los resultados de este estudio determinaron una eficacia bactericida del hipoclorito de sodio 1% cercana al 65% , lo que reafirma que este por si solo no es suficiente para ser utilizado como una solución irrigante efectiva.

Para suplir esta capacidad bactericida disminuida de hipoclorito al 1% se utilizó junto al agua ozonizada, en base a las excelentes propiedades que le atribuye la última evidencia científica disponible. El agua ozonizada está cada vez más presente en la literatura siendo utilizada de diversas maneras, en general y de acuerdo a la evidencia científica esta requiere de algún coadyuvante para aumentar su eficacia como por ejemplo sistemas de activación de ultrasonido u otros.

El hallazgo principal de este estudio indica que el agua ozonizada con hipoclorito de sodio al 1% como protocolo de irrigación tiene un eficacia bactericida absoluta, lo que sugiere que sería factible realizar en un futuro estudios clínicos controlados que permitieran reafirmar los resultados obtenidos in vitro y reemplazar así el irrigante Gold estándar utilizado hasta el momento.

El protocolo de irrigación propuesto por el estudio, comparado con los otros protocolos utilizados en la investigación, es el que más se acerca a cumplir con las características del irrigante ideal según Kandaswamy 2010¹⁶.

El ozono presenta diferentes mecanismos de acción terapéutica y bactericida lo que en consecuencia atañe al agua ozonizada, ya que esta es solo un vehículo de transporte como tantos otros.

Uno de los pilares fundamentales para justificar este estudio fue explotar las propiedades que tiene el agua ozonizada al interactuar con tejidos vivos. Destacando dentro de las más importantes su acción inmunoestimulante⁴³, anti-hipoxica⁴³, analgésica⁴⁴, antiinflamatoria y cicatrizante^{43,45}.

Por si solo el agua ozonizada presenta características que la hacen una muy buena opción al momento de elegir una solución irrigante según Broadwater⁵⁴ bajas concentraciones de agua ozonizada son suficientes para inactivar células bacterianas y sus esporas. Otro autor demuestra en su estudio que el agua ozonizada tiene una

efectividad del 100% en 60 segundos contra las bacterias *Streptococcus Mutans*, *Lactobacilos Casei* y *Actinomyces Naeslundii*⁵⁵.

Según Sadatullah y cols el agua ozonizada afecta la viabilidad de los microorganismos patógenos de dos maneras, una es mediante la inactivación directa de la célula bacteriana por oxidación, y por otro lado alterando el ecosistema normal de la placa mediante la creación de un ambiente rico en oxígeno después de la disociación del ozono⁵⁶.

En nuestro estudio el protocolo de agua ozonizada fue un eficaz bactericida en comparación con el grupo control a las 24 horas, eliminando el 100% de la microbiota al igual que Nagayoshi et al⁴⁹ informó que después de la irrigación con agua ozonizada, la viabilidad de *Streptococcus Mutans* y *Enterococcus Faecalis*, invadiendo túbulos dentinarios reduce significativamente. Por otro lado, los resultados se obtuvieron utilizando un tiempo de irrigación del agua ozonizada de un minuto, similar al tiempo de irrigación utilizado por Białoszewski et al⁴⁷, quien después de 30 segundos de exposición determinó que agua ozonizada era un agente bactericida eficaz contra las biopelículas.

Las implicancias de este estudio radican en la posibilidad de reemplazar el hipoclorito en altas concentraciones debido a sus características altamente tóxicas y perjudiciales para los tejidos vivos frente a la posibilidad de ser extruido, se pretende ser una base para futuros estudios clínicos que puedan continuar con esta línea de investigación de forma de obtener mejores resultados que prueben la factibilidad de utilizarlo en conductos de dientes endodonciados e insertos en tejidos vivos.

Limitaciones y sugerencias

Este estudio se basa en un experimento in vitro donde las condiciones experimentales pueden no corresponder a las condiciones reales dentro del sistema de conductos radiculares, por lo que se pueden producir resultados poco exactos.

Consideramos como una debilidad solo medir el efecto antibacteriano de los irrigantes utilizados, teniendo en cuenta que el hipoclorito también posee efectos de solventes de tejidos.

Torabinejad 2010 plantea que la infección endodóntica es de carácter polimicrobiano con un predominio de bacterias anaerobias estrictas en las infecciones primarias².

Ya que para este experimento se utilizaron medios de cultivos para aerobios y anaerobios facultativos, el estudio contaría con baja representatividad bacteriana al dejar fuera a la flora anaerobia estricta. Además las bacterias utilizadas en la investigación no poseen la misma organización del biofilm característico del SCR.

En los resultados el agua ozonizada como potenciador del hipoclorito al 1% fue un antimicrobiano tan eficaz como el hipoclorito de sodio al 5.25% en 24 horas, sin embargo no se realizaron mediciones en otros momentos por lo que no se puede medir si su eficacia antimicrobiana disminuyó en el tiempo. Teniendo en consideración la capacidad difusora de los irrigantes a las zonas más profundas de los túbulos dentinarios y las irregularidades del sistema de conductos donde podrían existir bacterias residuales.

Finalmente es considerado una desventaja el no contar con pruebas que permitan realizar una identificación bacteriana exacta de las colonias analizadas.

En investigaciones futuras se sugiere evaluar la efectividad del agua ozonizada sobre la microbiota anaerobia facultativa y estricta, siendo esta última la predominante en infecciones endodónticas primarias. Además recomendamos utilizar pruebas de identificación bacteriana que permitan detectar exactamente al microorganismo involucrado.

Se recomienda realizar estudios adicionales que investiguen sobre la concentración óptima del agua ozonizada, así como su profundidad de la acción en los túbulos dentinarios y el momento ideal para conseguir un efecto antimicrobiano total.

En una próxima investigación se sugiere medir tanto el efecto antimicrobiano como las otras propiedades de los irrigantes estudiados.

X. CONCLUSIÓN

Conclusión general:

El efecto antimicrobiano del agua ozonizada, utilizada como irrigante coadyuvante a la acción del hipoclorito de sodio al 1% y suero fisiológico en conductos de dientes humanos inoculados con cultivo de pulpa necrótica es absoluto.

Conclusiones específicas:

I. Antes de aplicar los protocolos de irrigación se cuantificaron en promedio un total de colonias bacterianas de 36.557.142 en el grupo del hipoclorito de sodio 1%, 38.171.428 en el grupo de hipoclorito de sodio 1% más agua ozonizada, 56.800.000 en el grupo de hipoclorito de sodio 5.25% y 37.285.714 en el grupo de suero fisiológico. Después de aplicar cada protocolo de irrigación se cuantificaron en promedio un total de colonias bacterianas de 13.985.714 en el protocolo hipoclorito 1% y 87.771.428 protocolo con suero fisiológico, mientras que el protocolo de hipoclorito 1% más agua ozonizada y en el protocolo de hipoclorito de sodio al 5.25% no existían colonias.

II. Los dos protocolos de irrigación más efectivos, en orden decreciente, son los de hipoclorito 1% más agua ozonizada y de hipoclorito de sodio 5,25%. Luego el de hipoclorito de sodio 1% y finalmente en el suero fisiológico.

III. Las bacterias más prevalentes en los cultivos de pulpa necrótica corresponden a *S. epidermidis*, *S. Grupo A*, *L. Acidophylus*.

XI. RESUMEN

Objetivo: evaluar el efecto antimicrobiano coadyuvante del agua ozonizada utilizada dentro de un protocolo de irrigación preestablecido con hipoclorito de sodio al 1% y suero fisiológico, en conductos de dientes humanos inoculados con cultivo de pulpa necrótica.

Materiales y métodos: se trabajó con una muestra de 28 raíces de premolares preparados y seleccionados bajo los mismos criterios de homogenización. Se dividieron en cuatro grupos de siete raíces cada uno según la secuencia de irrigación que se utilizó sobre ellos. Se extrajo una muestra de pulpa necrótica la cual se cultivó para obtener un cultivo madre con el cual se inocularon y cultivaron cada una de las raíces, se cuantificó la cantidad de UFC en los cultivos iniciales de cada grupo los que luego de ser sometidos a sus respectivas secuencias de irrigación volvieron a cultivarse para obtener los cultivos finales y cuantificar las UFC presentes. Finalizado esto se determinó el poder bactericida de cada secuencia de irrigación según la disminución en la cantidad de UFC de los cultivos finales respecto a los iniciales

Resultados: el hipoclorito de sodio al 1% con agua ozonizada tiene un efecto bactericida similar al hipoclorito de sodio al 5,25%, y significativamente mayor que el efecto bactericida del hipoclorito de sodio al 1%.

Conclusión: el efecto antimicrobiano del agua ozonizada, utilizada como irrigante coadyuvante a la acción del hipoclorito de sodio al 1% es absoluto, ya que esta mostró una eficacia bactericida del 100% a las 24 horas de la irrigación.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Totorá GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología. 9th Edición. Buenos Aires: Editorial médica panamericana; 2007. Capítulo 1: Bases de la microbiología; p. 2 - 10.
2. Torabinejad M, Walton RE. Endodoncia principios y práctica. 4th Edición. Barcelona: Elsevier; 2010. Capítulo 3: Microbiología endodóntica; p. 38-44.
3. Ohara PK, Torabinejad M. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol.* 1993 Jun. 9(3):95-100.
4. Chavez LE, Dahlén G, Molander A, Moller A. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod Journal.* 2003 Jul. 36(7):500–508.
5. Liébana J, Andrés MT, Álvarez M, Arancegui NO, Aznar J, Baca A. Microbiología Oral. 2th Edición. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2002. Capítulo 56: Microbiología de los Procesos Endodónticos; p. 595- 620.
6. Estrela C. Ciencia Endodóntica. 1th Edición. Sao Paulo: Artes Médicas Latinoamérica; 2005. Capítulo 5: Aspectos microbiológicos en endodoncia; p. 234-278.
7. Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 May. 97(5):632-41.
8. Liébana J, Andrés MT, Álvarez M, Arancegui NO, Aznar J, Baca A. Microbiología Oral. 2th Edición. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2002. Capítulo 12: Antibióticos concepto y clasificación; p 115-126.
9. Totorá G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9th Edición. Buenos Aires: Editorial médica panamericana; 2007. Capítulo 6: Crecimiento microbiano; p. 177.
10. Liébana J, Andrés MT, Álvarez M, Arancegui NO, Aznar J, Baca A. Microbiología Oral. 2th Edición. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2002. Capítulo 8: Ciclo celular y crecimiento bacteriano; p 77-82.
11. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A, Trevino E. Bailey & Scott's Diagnóstico microbiológico. 12th Edición. Argentina: Editorial panamericana; 2009. Capítulo 7: Cultivos e identificaciones tradicionales. p. 113 -140.
12. Cavallini E, Coronado M, Chavarría F, Hidalgo J. Bacteriología general: Principios y Prácticas de laboratorio. 2th Edición. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2005. Capítulo 6: Observación microscópica de bacterias. p. 63-70.
13. Zendejas-Manzo GS, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed.* 2014. 25:129-143.
14. Berman L, Cohen S, Hargreaves K. Vías de la pulpa. 10th Edición. Barcelona: Elsevier; 2011. Capítulo 8: Instrumentos, materiales y dispositivos. p. 206-207.

15. Ilson J, Goldberg F. Endodoncia Técnica y fundamentos. 2th Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2002. Capítulo 8: Procedimientos químicos auxiliares. p. 127-130.
16. Kandaswamy D, and Nagendrababu V. Root canal irrigants. *J Conserv Dent*. 2010 Oct-Dec. 13(4): 256–264.
17. Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rôças IN, Siqueira JF. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod*. 2011 Apr. 37(4):496-501.
18. Castelo P, Martín B, Cantatore G, Ruíz M, Bahillo, J, Rivas B, Varela P. In Vitro Comparison of Passive and Continuous Ultrasonic Irrigation in Simulated Lateral Canals of Extracted Teeth. *Journal of Endodontics*. 2010. 38:688–91
19. Leonardo MR. Endodoncia: Tratamiento de conductos radiculares principios técnicos y biológicos. 1th Edición. Brasil: Artes medicas latinoamericanas; 2005. Capitulo 13: Preparación biomecánica de los conductos radiculares. p. 435 -476.
20. García F, Murray PE, García-Godoy F, Namerow KN. Effect of Aquatine Endodontic Cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. *J Appl Oral Sci*. 2010 Jul-Aug. 18(4): 403-8.
21. Ingle JI, Leif K. Endodontics. 6th Edición. Estados Unidos: Editorial Mac Graw Hill; 2008. Capitulo 24: The medically complex endodontic patient. p. 770-780.
22. Sirtes G, Waltimo T. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod*. 2005 Sep. 31(9):669-71.
23. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J*. 2006 Nov. 39(11):878-885.
24. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The Effect of Exposure to Irrigant Solutions on Apical Dentin Biofilms In Vitro. *J Endod*. 2006 May. 32(5):434-437.
25. Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the Antimicrobial Activity of Six Irrigants on Primary Endodontic Pathogens. *J Endod*. 2005 Jun. 31(6):471-473
26. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J*. 2006 Jan. 39(1):10-17.
27. Spano JC, Barbin EL, Santos TC, Guimaraes LF, Pecora JD. Solvent action of sodium Hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. *Braz Dent J*. 2001. 12:154-157.
28. Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical Reduction of the Bacterial Population in the Root Canal after Instrumentation and Irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% Sodium Hypochlorite. *J Endod*. 2000 Jun. 26(6):331-334.
29. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan M, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz dent J*. 2002. 13(2):113- 117.
30. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006 Feb. 3(2):93-98.

31. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan. 97: 79-84.
32. Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solution on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *J Endod.* 2004 Nov. 30(11):792-95.
33. Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCL and chorhexidine using a contact test. *Braz dent J.* 2003.14(2):99-102.
34. Gursoy UK, Bostanci V, Kosger HH. Palatal mucosa necrosis because of accidental sodium hypochlorite injection instead of anaesthetic solution. *Int Endod J.* 2006 Feb. 39(2):157-61.
35. Serper A, Ozbek M, Calt S. Accidental sodium hypochlorite-induced skin injury during endodontic treatment. *J Endod.* 2004 Mar. 30(3):180-83.
36. Gambarini G, De Luca M, Gerosa R. Chemical stability of heated sodium hypochlorite endodontic irrigants. *J Endod.* 1998 Jun. 24(6):432-4.
37. Baeza Noci J. La ozonoterapia en el tratamiento de la patología del aparato locomotor. *Foros de debate SECOT.* 2005. 4:49-54.
38. Alcantara Barbosa M. Química Inorgánica moderna. 2th Edición. México: Editorial Eclalsa; 1975. Capitulo 2: Química inorgánica. p.146.
39. Batakliiev T, Georgiev V, Anachkov M, Rakovsky S, Rakovsky S. Ozone decomposition. *Interdiscip Tóxicol.* 2014 Jun.7(2): 78.
40. Elvis A, Ekta J. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* 2011 Jan-Jun.2(1):66-70.
41. Gupta G, Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life.* 2012 Feb. 5(1):59-67.
42. Moggiano R. Tecnología de vanguardia. Ozonoterapia. *DT Latinamerica.* 2014 Apr.16 – 22.
43. Seidler V, Linetskiy I, Hubalkova H. Ozone and Its Usage in General Medicine and Dentistry. *Prague Medical Report.* 2008 Feb. 109(1):5–13.
44. Kazancioglu H, Ezirganli S, Demirtas N. Comparison of the influence of ozone and laser therapies on pain, swelling, and trismus following impacted third-molar surgery. *Lasers Med Sci.* 2014 Jul. 29(4):1313-1319.
45. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci.* 2006 Oct. 114(5):435-40.
46. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dental Pract.* 2008 May. 1;9(4):75-84.
47. Bialoszewski D, Pietruczuk-Padzik A, Kalicinska A, Bocian E, Czajkowska M, Bukowska B, Tyski S. Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Med Sci Monit.* 2011 Nov. 17(11): 339-344.
48. Goztas Z, Onat H, Tosun G, Sener Y, Hadimli HH. Antimicrobial effect of ozonated water, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in primary molar root canals. *Eur J Dent.* 2014 Oct. 8(4):469-74.

- 49.** Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod.* 2004 Nov. 30(11):778-81.
- 50.** Alamo-Palomino J, Guardia-Huamaní SA, Mendoza-Lupuche R, Guerra Barrera LM. Effectiveness of three irrigants on the number of colonies of enterococcus faecalis in root canal preparation in vitro. *KIRU.* 2015 Ene-jun. 12(1):8-12.
- 51.** Dominici JT, Eliezer PD, Clark SJ, Staat RH, Scheetz JP. La desinfección/esterilización de los dientes extraídos para uso de los estudiantes dentales. *J Dent Educ.* 2001 Nov. 65(11):1278-1280.
- 52.** Huang AH, Chen YK, Chan AW, Shieh TY, Lin LM. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from non extracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J Endod.* 2009 May.35(5):673-81.
- 53.** Ihsan H, Recai Z, Tutku T, Zeynep S. Antibacterial efficacy of aqueous ozone in root canals by Enterococcus faecalis. *Jundishapur J microbiol.* 2014 Jul. 7(7):11411.
- 54.** Broadwater WT, Hoehn RC, King PH. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Appl Microbiol.* 1973 Sep.26(3):391-3.
- 55.** Johansson E, Claesson R, van Dijken JW. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *J Dent.* 2009 Jun.37(6):449-53.
- 56.** Sadatullah S, Himazian MN, Abdul FR. Antimicrobial effect of 0.1 ppm ozonated water on 24-hour plaque microorganisms in situ. *Braz Oral Res.* 2012. Mar-Apr. 26(2):126-31

XII. ANEXOS

Anexo 1: Selección Dentaria

Del total de dientes obtenidos se seleccionaron un total de 28 dientes que cumplieron con los siguientes criterios de selección y de exclusión:

Selección dentaria	
Criterios de Selección	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> • Dientes sanos • Dientes con raíz integra • Dientes unirradiculares de conducto principal único y recto • Dientes de conducto permeable • Dientes sin alteración de forma y estructura • Dientes que no hayan sido tratados endodónticamente • Dientes cuyo instrumento apical inicial corresponda a lima K #15 o mayor • Dientes extraídos por indicación ortodóncica 	<ul style="list-style-type: none"> • Dientes con alteraciones de mineralización que afecten la integridad de la dentina y/o cemento • Conductos muy calcificados o atresicos • Dientes cuyo conducto tenga una curvatura moderada a severa • Conductos cuyo instrumento apical inicial sea menor a lima K#15 • Dientes multirradiculares • Dientes con más de un conducto • Dientes con endo o exorisalasis • Dientes tratados endodónticamente

Tabla XIV. Criterios de selección dentaria para el investigación

Anexo 2: Protocolo WaveOne™

Sistema de instrumentación WaveOne™ Densply

1. Composición:

La parte cortante de estos instrumentos está fabricada con una aleación de níquel titanio.

2. Indicaciones de uso:

Se utilizan en el tratamiento endodóntico, para la limpieza y conformación de los conductos radiculares.

No deberían utilizarse en aquellos casos que presenten curvaturas apicales severas y bruscas.

3. Procedimiento:

1. Establecer un acceso coronal en línea recta hasta el orificio de entrada del conducto radicular.

2. Estimar la longitud de trabajo mediante radiografías

3. Crear una permeabilidad del conducto usando suavemente la lima K 10, con la ayuda de irrigación, hasta que se encuentre resistencia y la lima ya no avance más. Luego, se trabaja hasta que la lima tenga holgura en el conducto.

4. Selección de la lima WaveOne™ large: Si la lima K 20 alcanza con facilidad la longitud estimada, entonces el tamaño adecuado es el WaveOne™ large (040 .08)

5. Iniciar la preparación con la lima WaveOne™ seleccionada, junto con el irrigante. Realizar un movimiento de picoteo suave hacia adentro, con avances de 2-3 mm de profundidad, hasta que la lima WaveOne™ avance en forma pasiva, y se note resistencia.

6. Sacar la lima WaveOne™, eliminar los restos de dentina e inspeccionar las espiras cortantes, irrigar y repetir los pasos 3 y 5 hasta haber conformado los dos tercios coronales del conducto radicular.

7. Preparar el tercio apical del conducto con una lima K 10 junto con un irrigante. Utilizar esta lima con suavidad hasta que quede completamente suelta al alcanzar la longitud de trabajo estimada.

8. Establecer la longitud de trabajo final, confirmar la permeabilidad apical, verificar que el conducto es totalmente permeable e irrigar.

9. Usar la lima WaveOne™ a la longitud de trabajo final. Se considera terminada la preparación cuando las espiras apicales de la lima están llenas de dentina. Irrigar, recapitular, y volver a irrigar. Calibrar el tamaño del foramen apical con una lima manual ISO del mismo diámetro que la lima WaveOne™ que alcanzó la longitud de trabajo. Si la lima manual de calibrado ofrece resistencia cuando alcanza la longitud de trabajo, la preparación ha terminado.

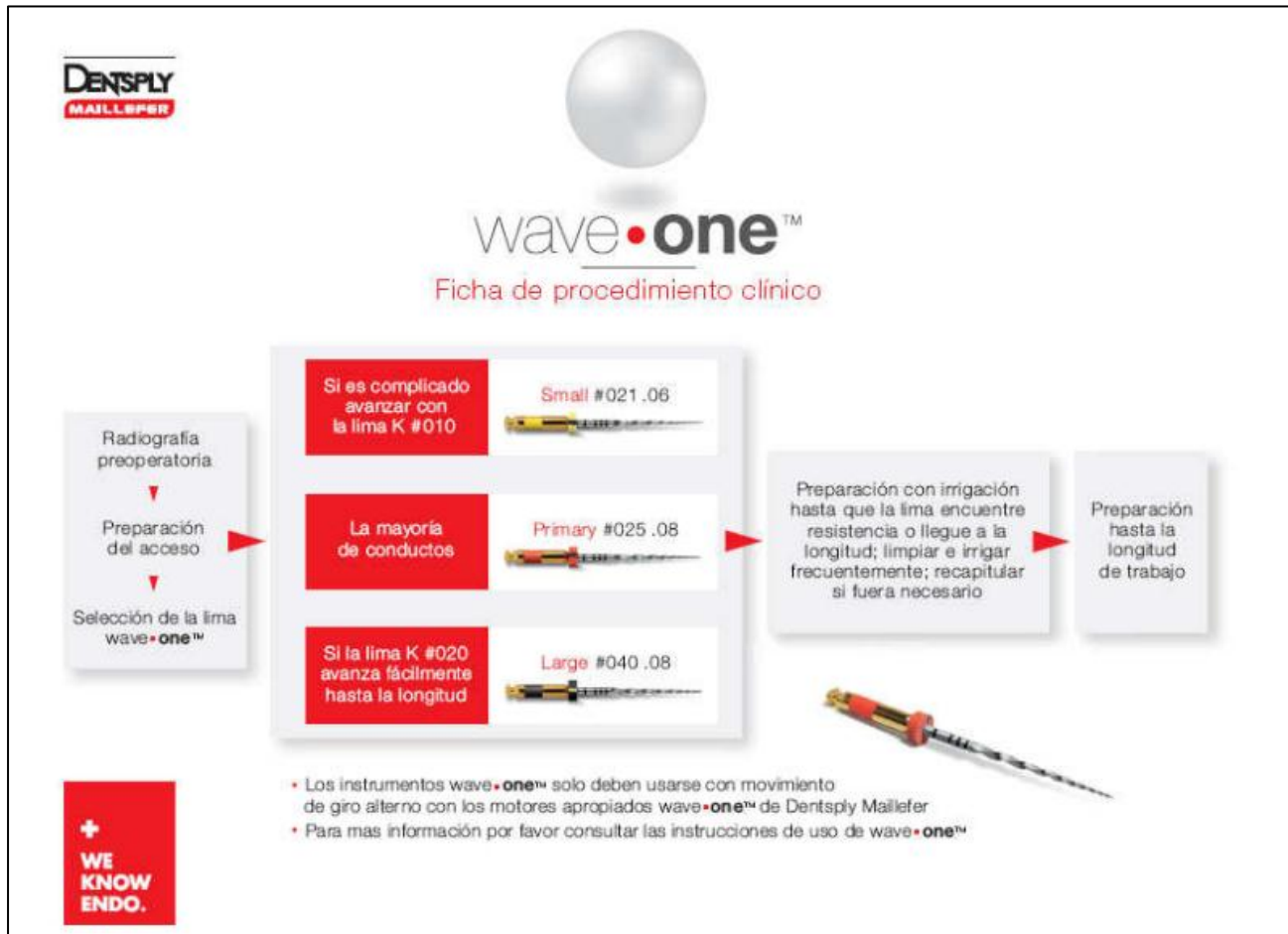


Figura 80. Ficha de procedimiento clínico WaveOne™ Dentsply

Anexo 3. Normas de bioseguridad de la Facultad de Odontología Universidad de Valparaíso 2015

Grupo de trabajo:

Dr. Jaime Jamett Rojas, Director de Unidad de Servicio Clínicos, Facultad de Odontología, Universidad de Valparaíso.

Ivette Marticorena Sartori, Enfermera de Facultad de Odontología, Universidad de Valparaíso

Aprobado por:

Aprobado el día Miércoles 9 de Julio del año 2015, por el Consejo de Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

Puntos relevantes para Investigación:

1. Esterilización de raíces:

1.1 Procedimiento de esterilización

La esterilización y desinfección constituye un eficiente mecanismo para la prevención de IAAS. Este proceso está compuesto de varias etapas en las que participan activamente los alumnos de esta Facultad, estas son Lavado, Inspección y Empaque. Parte de ellas las efectuarán en “Sala de Lavado”.

1.1.1 Transporte de Instrumental Contaminado:

Todo instrumental utilizado durante la atención odontológica se deposita en cajas plásticas con tapas que se manejan en áreas sucias de cada unidad. Estas cajas deben manejarse con detergente enzimático en su interior, para evitar adherencia de materia orgánica. El traslado desde el box de atención hasta Sala de Lavado, debe efectuarse con caja con tapa cerrada, para evitar derrames. Este traslado debe ser inmediatamente posterior a las atenciones realizadas durante la jornada. No postergar el lavado de instrumental. El instrumental contaminado debe ser procesado el mismo día en que se utilizó. Recordar que algunos virus como la Hepatitis B sobreviven a temperatura ambiente en sangre seca durante una semana.

1.1.2 Empaque:

En esta etapa se utilizará solo empaques grado médico, en este caso mangas de papel mixto, que son una combinación de papel grado médico con polímero transparente, compatible con autoclaves. Desde área de lavado se debe trasladar instrumental limpio y seco hacia área de empaque. El área de empaque es considerada limpia, por tanto el flujo de circulación es unidireccional, no se debe devolver con material limpio a área de lavado, considerada área sucia. Depositar solo instrumental sobre mesa de empaque. Esta mesa es área limpia, en ella no se debe colocar bolsos ni celulares. Se recomienda proteger todo el instrumental que tenga filos o puntas, con gomas de silicona, evitando punciones del empaque. Empaquetar instrumental o

material en las mangas dejando un 20% libre para evitar la ruptura del empaque producido por los cambios de presión dentro de autoclaves. El tamaño de los paquetes debe permitir la penetración efectiva del vapor a la totalidad del contenido. Los paquetes no deben ser muy densos ni de gran volumen. Los empaques deben ser sellados por calor. No utilizar corchetes, ni alfileres, ni clip, ni elásticos para sellar o acumular paquetes. Cada empaque debe contar con un control químico interno, además del externo presente en las mangas. El termosellado debe ser realizado a 2-3 cm de la orilla del empaque, para una correcta apertura del paquete y presentación del instrumental. En cada empaque debe colocar etiqueta que indique N° de Alumno y Fecha de Vencimiento. No escribir el empaque con plumón. Con todo el instrumental empaquetado, se realiza entrega por ventanilla a personal de Esterilización para continuar proceso. Todo material entregado a Central de Esterilización debe ser registrado con fecha, nombre del alumno, tipo de instrumental y cantidad. La unidad de esterilización se reserva el derecho de no recibir los empaques que no cumplan con esta normativa.

2. Manejo Jeringas de Insulina:

2.1 Prevención de Accidentes Cortopunzantes:

Use siempre las cajas cortopunzantes de color amarillo dispuestas en la unidad para eliminar todo elemento cortopunzante : agujas, bisturí, etc. No eliminar agujas en tacho de basura común, ni abandonar agujas en cualquier lugar. No doblar ni romper agujas. No recapsular agujas. No tomar agujas con la mano. Desmontar agujas de jeringas de cualquier tipo con pinzas (Kelly, Anatómica, Kocher). Desmontar bisturí de mangos con pinzas. No entregar “mano a mano” ningún artículo cortopunzante. Desmontar la fresa una vez terminada la atención del paciente y tener especial cuidado durante su uso.

3. Manejo de residuos:

El manejo apropiado de los residuos generados en las diferentes unidades clínicas de la Facultad tiene como objetivo prevenir riesgos a la salud y medioambiente. Las normas REAS (Residuos de Establecimientos de Atención de Salud), del Ministerio de Salud dicta pautas para el manejo de residuos clínicos y los clasifican en cuatro categorías, definiendo el manejo de cada una de ellos.

3.1 Clasificación de residuos:

3.1.1 Residuos Especiales:

Que contienen o pueden contener agentes patógenos en cantidades o concentraciones que potencialmente podrían causar enfermedad en huésped susceptible. De acuerdo a esta clasificación, en la Facultad se generan los siguientes:

- **Cultivos y muestras almacenadas:** correspondientes a procedimientos realizados en laboratorio de investigación, por ejemplo placas de cultivo.

- **Residuos patológicos:** Correspondientes restos biológicos tales como tejidos u órganos.
- **Sangre y productos derivados:** presentes en tómulas de algodón y gasas saturadas.
- **Cortopunzantes:** Agujas, bisturí.

3.2 Eliminación de Residuos:

3.2.1 Residuos cortopunzantes: En el área sucia de cada módulo de atención dental encontrará una caja de color amarillo destinada para la eliminación de este tipo de desechos. Solo eliminar en ellas agujas de sutura, de carpule, de jeringas y hojas de bisturí. Los elementos cortopunzantes deben ser eliminados inmediatamente después de ser usados, no al término de la jornada, usando para ello siempre pinzas. Las agujas deben ser desmontadas y manipuladas con pinzas para su eliminación. No recapsular agujas. Cortar el hilo a las agujas de sutura antes de eliminarlas. Nunca tratar de sacar o manipular objetos de las cajas cortopunzantes. Las cajas cortopunzantes solo se llena alcanzando 2/3 de su capacidad. Si la caja ha sobrepasado su límite de llenado, debe informar a asistente de la unidad que corresponda para su reemplazo.

3.2.2 Residuos patológicos / Sangre y productos derivados: En clínica post extracciones se requiere eliminar dientes (residuos patológicos) y tómulas o gasas saturadas con sangre. Todos ellos se eliminan en tacho pequeño forrado con bolsa plástica ubicado en braquet. Esta bolsa se retira del tacho, se cierra y se elimina en contenedor amarillo rotulado "Residuos Biológicos".

3.2.3 Otros residuos: La eliminación del resto de residuos generados durante la atención odontológica como son empaques, guantes, eyectores, etc, eliminar en tacho de desechos común ubicados en cada box y recubiertos con bolsa plástica negra.

Anexo 4: Consentimiento informado

1. Formulario informativo dirigido al donante de pulpa necrótica:

Es usted invitado a participar en la investigación "EVALUACIÓN DEL AGUA OZONIZADA COMO IRRIGANTE COADYUVANTE DE LA ACCIÓN DEL HIPOCLORITO DE SODIO AL 1% EN CONDUCTOS DENTARIOS INOCULADOS CON MICROBIOTA"

Investigadores:

Dr. Carlos Marchant Pizarro, Especialista en Endodoncia.

Alumnos: Valentina Cabrera Alfaro, Joaquín Navarro Tapia y Marcela Aedo Aedo.

Junto con saludarlo le explicaremos brevemente nuestro proyecto de tesis y en lo que consistirá su participación en ella. Somos estudiantes de odontología de sexto año de la Universidad de Valparaíso y estamos realizando una investigación que corresponde a nuestro seminario de tesis para optar al título de Cirujano Dentista. Nuestro proyecto consiste en comparar la eficacia bactericida de distintos químicos utilizados (soluciones irrigantes) en el tratamiento de endodoncia, nuestra tesis es un estudio *in vitro* por lo que necesitamos obtener tejido pulpar necrótico fresco para poder cultivarlo, obtener sus bacterias y así poder medir lo que estamos buscando. Cualquier duda que tenga, siéntase con todo el derecho a preguntar.

Nuestro objetivo principal es inocular los dientes humanos con microbiota (bacterias) provenientes de una pulpa necrótica lo que nos asegurará que las bacterias que ahí encontraremos serán aquellos patógenos característicos que busca eliminar el tratamiento de endodoncia.

Su participación en el presente estudio no requerirá nada más que la donación del tejido pulpar necrótico que le extirpen dentro del tratamiento de endodoncia que usted vino a realizarse, por ende no involucra ninguna acción extra fuera de lo que es cumplir con su rol de paciente durante la realización del tratamiento de endodoncia que se llevara a cabo según los protocolos que dicta nuestra universidad. Una vez obtenido este tejido su participación habrá concluido.

Su participación es voluntaria, y de no participar, se realizará el tratamiento de la misma forma solo que los tejidos biológicos involucrados (incluido el tejido pulpar necrótico extraído) serán eliminados de acuerdo a las normas de eliminación de desechos biológicos.

Cabe destacar que el procedimiento al cual será sometido no presenta el riesgo de complicaciones ni reacciones adversas asociadas al hecho de extraer el tejido necrótico con extractores pulpares, ya que esto es algo que se hace en todo tratamiento de endodoncia.

De presentarse cualquier inquietud, puede comunicarse con nosotros. Si usted ya no quiere participar en este procedimiento está en derecho de retractarse de hacer la donación aun que antes hubiera aceptado.

Los datos personales obtenidos durante la investigación son confidenciales y solo los investigadores tendrán acceso a estos.

En caso de consultas puede contactarnos al número 73348583 o a vía e-mail valentinacabrera.a@gmail.com

Este estudio ha sido aprobado por el comité de bioética de la Universidad de Valparaíso.

2. Consentimiento informado dirigido a donante de pulpa necrótica:

He sido invitado a participar en la investigación "EVALUACIÓN DEL AGUA OZONIZADA COMO IRRIGANTE COADYUVANTE DE LA ACCION DEL HIPOCLORITO DE SODIO AL 1% EN CONDUCTOS DENTARIOS INOCULADOS CON MICROBIOTA"

Entiendo que seré donante voluntario de tejido pulpar necrótico, procedimiento que solo requerirá la extracción de la pulpa infectada durante la realización habitual del tratamiento de endodoncia por el cual acudí a la Clínica de Endodoncia de la Universidad de Valparaíso.

He sido informado que los riesgos son los mismos del procedimiento endodóntico convencional.

Se me ha proporcionado el nombre de los investigadores que pueden ser fácilmente contactados.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación como donante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera.

Nombre del Participante _____

Firma del Participante _____

Nombre del Investigador Principal: Carlos Marchant Pizarro.

Firma del Investigador Principal _____

Nombre del Director de la Institución: Antonio Radich M.

Firma del Investigador de la Institución _____

Fecha _____