

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**"Efecto del flujo controlado alternante de agentes quelantes  
Na<sub>2</sub>EDTA y Na<sub>4</sub>HEBP sobre la capacidad de disolución del  
hipoclorito de sodio, NaOCl"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Natalia Navarrete Marabini**

Directores

**Ana María Arias Paniagua**  
**José Carlos de la Macorra García**

Madrid  
Ed. electrónica 2019

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO  
ODONTOLOGÍA CONSERVADORA Y PRÓTESIS BUCOFACIAL**



*"Efecto del flujo controlado alternante de agentes quelantes  
Na<sub>2</sub>EDTA y Na<sub>4</sub>HEBP sobre la capacidad de disolución del  
hipoclorito de sodio, NaOCl "*

### **Tesis Doctoral**

Presentada por **Natalia Navarrete Marabini** para optar al grado de Doctor

#### **Directores:**

**Prof. Dra. Ana María Arias Paniagua**

Profesora Ayudante Doctora del Departamento de Odontología Conservadora y Prótesis Bucofacial

**Prof. Dr. José Carlos de la Macorra García**

Profesor Titular del Departamento de Odontología Conservadora y Prótesis Bucofacial

MADRID, 2018



## **Agradecimientos**

Aprovecho esta maravillosa oportunidad para agradecer a todas las personas que me han ayudado a realizar esta Tesis Doctoral, ya que sin ellas no habría visto la luz.

*GRACIAS*, en primer lugar a mis directores la **Dra. Ana Arias** y el **Dr. José Carlos de la Macorra** por aceptar ser mis guías, por su constante apoyo y motivación, por sus sabios conocimientos y oportunos consejos, su inagotable entusiasmo y dedicación. Durante este tiempo hemos compartido momentos de alegría, nervios e incluso flaqueza pero que me han servido para crecer como persona. Sencillamente, sois un ejemplo a seguir. Gracias a vosotros, mis maestros.

*GRACIAS* a la **Dra. M<sup>a</sup> Teresa Arias** por su colaboración en la valoración yodométrica de la metodología de esta Tesis Doctoral.

*GRACIAS* al personal del Laboratorio de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. Gracias a **Ana, María, Arancha y Leire** por su inestimable ayuda en la fase experimental y sus constantes ánimos.

*GRACIAS* a la veterinaria del Matadero de Leganés, **Amparo** por proporcionarme desinteresadamente el material bovino para poder realizar las muestras.

*GRACIAS* a mi querido profesor y amigo, **Dr. Juanjo Hidalgo** porque siempre ha estado apoyándome aunque los años pasen.

*GRACIAS* a **Jesús Urbina** por su paciencia inagotable conmigo en los temas informáticos.

Y *GRACIAS*, a todos aquellos que me han acompañado en este largo viaje. A los que fueron mis profesores del Máster de Endodoncia Avanzada de la Universidad Europea de Madrid, gracias a los cuales empecé a investigar en el campo de la irrigación. A mis compañeros de la Policlínica de la Universidad Europea de Madrid. A mis amigos del Máster de Endodoncia Avanzada de la Universidad Rey Juan Carlos por confiar plenamente en mí y darme tantas oportunidades. A **César de Gregorio**, por ser mi hermano endodóntico y poder compartir nuestra pasión por la Endodoncia. A todos aquellos que me dieron ánimos y energía para seguir. A mis **amigos** por su interés y apoyo y a **mi familia** por inculcarme los valores de esfuerzo y afán de superación. Y especialmente a mi marido, **Enrique**, que me sufre, me apoya y me ama sin límites siendo un maravilloso compañero de viaje.

A mis **padres**, por darme lo más preciado, la vida.

A mi marido **Enrique**, por su amor incondicional.

A mis hijos, **Enrique, Carmen y Ana**,

por ser mis tesoros y mi motivación.



# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	6
3. INTRODUCCIÓN.....	10
3.1. GENERALIDADES.....	12
3.2. TIPOS DE IRRIGANTES.....	15
3.2.1. Agentes disolventes de tejido orgánico: NaOCl.....	18
a. Sustrato sobre el que actúa.....	18
b. Características generales.....	20
c. Mecanismo de acción.....	21
d. Factores que influyen en su capacidad de disolución de tejido	24
3.2.2. Agentes disolventes de tejido inorgánico: quelantes.....	37
a. Sustrato sobre el que actúan.....	37
b. Características generales y mecanismo de acción.....	38
c. Tipos de quelantes.....	39
c.1. Quelantes fuertes: EDTA.	
c.2. Quelantes débiles: etidronato o HEBP.	
d. Factores que influyen en su capacidad quelante.....	40
3.3. INTERACCIONES entre agentes disolventes de materia orgánica e inorgánica.....	43
3.3.1. NaOCl-EDTA.....	43
a. Capacidad de disolución.	
b. Capacidad antimicrobiana.	
c. Capacidad quelante del EDTA.	
d. Formación de subproductos y precipitados.	
3.3.2. NaOCl-HEBP.....	47
a. Capacidad de disolución.	
b. Capacidad antimicrobiana.	
3.4. PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN: NaOCl-EDTA o NaOCl-HEBP.....	49
3.4.1. Alteración de la capacidad de disolución del NaOCl.....	49
3.4.2. Efecto antimicrobiano.....	51
3.4.3. Uso del quelantes durante la instrumentación.....	51
3.4.4. Capacidad quelante.....	52
3.4.5. Microdureza dentinaria.....	53
3.4.6. Influencia en la obturación del sistema de conductos.....	54

4. JUSTIFICACIÓN.....	56
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	60
5.1. OBJETIVO GENERAL.	
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
6.1. PREPARACIÓN DEL TEJIDO PULPAR BOVINO.....	66
6.2. GRUPOS Y SOLUCIONES.....	68
6.3. MÉTODO DE DISOLUCIÓN DE TEJIDO.....	70
6.4. MEDICIÓN DEL CLORO LIBRE, pH Y TEMPERATURA.....	72
6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
7. RESULTADOS.....	76
8. DISCUSIÓN.....	82
8.1. DISCUSIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
8.1.1. Tipo de tejido y estandarización.....	84
8.1.2. Soluciones irrigadoras.....	93
a. NaOCl.	
b. Quelantes.	
c. Agua destilada.	
8.1.3. Modelo de estudio mediante flujo controlado y continuo.....	96
8.1.4. Cuantificación de la capacidad de disolución y cloro libre....	98
8.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	103
8.2.1. Pérdida de peso o porcentaje de tejido remanente.....	103
a. Soluciones aisladas.	
b. NaOCl combinado con quelante.	
8.2.2. Otras variables.....	112
a. Determinación del contenido de cloro libre.	
b. pH.	
c. Temperatura y presencia de precipitado.	
9. CONCLUSIONES.....	120
10. BIBLIOGRAFÍA.....	124
11. ANEXOS.....	146



## **1. RESUMEN**



**Título: Efecto del flujo controlado alternante de agentes quelantes Na<sub>2</sub>EDTA y Na<sub>4</sub>HEBP sobre la capacidad de disolución del hipoclorito de sodio, NaOCl.**

**Introducción:** Uno de los principales objetivos de la endodoncia es la limpieza y desinfección del sistema de conductos radiculares. Aunque la instrumentación permite conformar el conducto principal, el sistema de conductos radiculares es muy complejo quedando zonas como son conductos laterales, istmos y deltas apicales no accesibles a los instrumentos de conformación. La irrigación es de vital importancia para la disolución y eliminación de la materia orgánica (tejido pulpar vital o necrótico y microorganismos) e inorgánica (restos dentinarios y barrillo dentinario) del interior del sistema de conductos. Como no existe un único irrigante que aúne la capacidad de disolver tejido orgánico e inorgánico simultáneamente, se requiere la combinación del hipoclorito de sodio (NaOCl) con un agente quelante. Sin embargo, se han observado interacciones al combinar irrigantes que pueden afectar a la capacidad de disolución del NaOCl.

**Objetivo:** Determinar la capacidad de disolución del hipoclorito de sodio (3% NaOCl) sobre el tejido pulpar bovino cuando se emplea un flujo controlado alternante de dos agentes quelantes: la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (Na<sub>2</sub>EDTA) o la sal tetrasódica del ácido etidróico (Na<sub>4</sub>HEBP).

**Metodología:** El tejido pulpar bovino fue extraído de incisivos inferiores de 10 mandíbulas bovinas (30-70 meses de edad). Las muestras de tejido fueron estandarizadas en tamaño (1x3x10mm), secadas y pesadas en una balanza electrónica de precisión (peso inicial (T<sub>0</sub>): media= 31,98 mg, DE=1,18). Las muestras de la misma mandíbula bovina se distribuyeron aleatoriamente entre los dos grupos controles (n=3, cada uno) y los cuatro grupos experimentales (n=10, cada uno): NC (control negativo/agua destilada), PC (control positivo/6% NaOCl), G1 (3% NaOCl), G2 (3% NaOCl/17% Na<sub>2</sub>EDTA), G3 (3% NaOCl/18% Na<sub>4</sub>HEBP) y G4 (3% NaOCl/9% Na<sub>4</sub>HEBP). El agua destilada y el NaOCl se dispensaron mediante un flujo controlado continuo de 1ml/min. Una segunda bomba administraba simultáneamente Na<sub>2</sub>EDTA en G2 y Na<sub>4</sub>HEBP en G3 y G4, de forma intermitente cada 30 segundos. El porcentaje de pérdida de peso se calculó a los 2, 5 y 10 minutos (T<sub>2</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>10</sub>). El cloro libre y el pH se controlaron en T<sub>0</sub> y T<sub>10</sub> y la temperatura en T<sub>10</sub>. Después de comprobar la distribución

normal de los datos, se aplicó el test de ANOVA de medidas repetidas para comparar el porcentaje de tejido remanente a lo largo del tiempo entre los distintos grupos. Se aplicó la corrección de Greenhouse-Geiser porque no se cumplió el supuesto de esfericidad de los datos. Cuando el test de ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas, se aplicó el test post-hoc de Tukey.

**Resultados:** El tejido pulpar se disolvió completamente en PC en T5. No se observó disolución de tejido en NC. En todos los grupos experimentales hubo una reducción significativa en el porcentaje de tejido remanente a lo largo del tiempo ( $p < 0,001$ ). Las diferencias entre los grupos experimentales no fueron estadísticamente significativas en el porcentaje de pérdida de peso en ninguno de los tiempos, excepto para G4 (3% NaOCl/9% Na<sub>4</sub>HEBP) que mostró significativamente más cantidad de tejido remanente tanto en T2 como en T5 ( $p < 0.001$ ) que G1 (3% NaOCl), aunque no existieron diferencias significativas con G2 (3% NaOCl/17% Na<sub>2</sub>EDTA) y G3 (3% NaOCl/18% HEBP). En T10 no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales; sin embargo, quedaron restos de tejido en G3 (m(DS)=1,4% (2,4)) y G4 (1,6% (2,3)); mientras que tanto en G1 como en G2 la disolución fue completa. El cloro libre no cambió en las soluciones aisladas recolectadas en PC y G1. Sin embargo, se observó una reducción del cloro libre en las soluciones recolectadas mezcladas (NaOCl con agente quelante) en T10. En el G2, la reducción del cloro libre fue del 54,4%, en el G3 del 33,3% y en el G4 del 38,9%. Tanto el Na<sub>2</sub>EDTA como el Na<sub>4</sub>HEBP disminuyeron el cloro libre a los 10 minutos en las soluciones mezcladas con NaOCl. En las soluciones recolectadas mezcladas en G2, hubo también una reducción del pH inicial del NaOCl y un aumento de la temperatura de la solución mezclada de 10°C.

**Conclusiones:** La disolución de tejido fue progresiva a lo largo del tiempo debido a la renovación constante de las soluciones. El Na<sub>2</sub>EDTA y el Na<sub>4</sub>HEBP al 18% dispensados bajo un flujo controlado alternante no inactivaron la capacidad de disolución del NaOCl. El Na<sub>4</sub>HEBP al 9% fue el único quelante que redujo la eficacia del NaOCl a los 2 y 5 minutos. Asimismo, la mezcla del NaOCl con cualquiera de los dos quelantes produjo una reducción del cloro libre, siendo más pronunciada con el Na<sub>2</sub>EDTA, el cual dio lugar a una reacción notablemente exotérmica con formación de burbujas y a un precipitado de la sal.

**Palabras clave:** disolución de tejido, hipoclorito de sodio,  $NaOCl$ , ácido etilendiaminotetracético,  $EDTA$ , etidronato, ácido etidróico,  $HEBP$ ,  $HEDP$ , flujo alternante, flujo continuo.

## **2. ABSTRACT**



**Title: Effect of the alternate delivery of chelating agents Na<sub>2</sub>EDTA y Na<sub>4</sub>HEBP under controlled flow on the pulp tissue dissolution ability of sodium hypochlorite, NaOCl.**

**Introduction:** The combination of mechanical preparation and chemical disinfection is necessary for a successful endodontic therapy. The irrigation plays an important role since mechanical instrumentation alone cannot reach the internal anatomic complexities of the root canal system. As the ideal irrigant has not been described yet to eliminate organic and inorganic matter at the same time, a combination of irrigants is needed for proper tissue dissolution, reduction of biofilm, cleaning of unprepared areas and removal of debris and of the smear layer produced on the dentinal tubules by the action of endodontic shaping instruments. But chemical interactions can occur when different irrigants are combined affecting their properties.

**Objective:** The purpose of this study was to evaluate pulp tissue-dissolution ability of sodium hypochlorite (NaOCl) when alternated with disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid (Na<sub>2</sub>EDTA) and etidronate (Na<sub>4</sub>HEBP) under a controlled flow.

**Methods:** Bovine pulp tissue was extracted from the lower incisors of 10 bovine jaws (30-70 months old) dissected after death. Pulp specimens were standardized in size (1x3x10mm), blotted dried and weighed using a hermetic precision electronic balance (initial weight (T<sub>0</sub>): mean= 31.98 mg, SD=1.18). Specimens from the same bovine jaw were randomly assigned to 2 control (n=3 each) and 4 experimental groups (n=10 each): NC (negative control/distilled water), PC (positive control/6% NaOCl), G1 (3% NaOCl), G2 (3% NaOCl/17% EDTA), G3 (3% NaOCl/18% HEBP) and G4 (3% NaOCl/9% HEBP). Distilled water and NaOCl were provided with a delivery pump under a continuous controlled rate (1ml/min). A second pump alternately delivered either Na<sub>2</sub>EDTA or Na<sub>4</sub>HEBP with a 30-second programmed interval at the same rate. Percentage of tissue weight loss was calculated at 2, 5 and 10 minutes (T<sub>2</sub>, T<sub>5</sub> and T<sub>10</sub>). Free available chlorine and pH were controlled at T<sub>0</sub> and T<sub>10</sub>. After confirming the assumption of normal distribution of data, a repeated measures ANOVA was used to detect any overall difference in the percentage of remnant tissue across time points and groups. A Greenhouse-Geisser correction was applied to the repeated-measure ANOVA

because the data violated the assumption of sphericity. Tukey post-hoc test was used for pairwise comparisons when repeated measures ANOVA demonstrated significant differences.

**Results:** No tissue was remnant in PC at T5. Tissue-dissolution was not observed in NC. There was a significant reduction in the percentage of remnant tissue over time for all groups ( $p < 0.001$ ). There were no significant differences in the percentage of weight loss among experimental groups at any point time, except for G4 that showed significantly more remnant tissue at both T2 and T5 ( $p < 0.001$ ) than G1, although no significant differences were detected when compared to G2 and G3. At the same time, no significant differences were detected among groups at T10; however, some remnant tissue was found in G3 ( $m(SD) = 1.4\% (2.4)$ ) and G4 ( $1.6\% (2.3)$ ) at T10, whereas nothing remained in G1 and G2. Free available chlorine was not reduced in PC and G1; however, a reduction was found in supernatant solutions that contained any of the chelators used in the study (54.4%, 33.3% and 38.9% respectively for G2, G3 and G4). G2 supernatant solution also showed a decrease in the pH and a 10°C increase in temperature.

**Conclusions:** The constant renewal of the solutions allowed a progressive dissolution of tissue over time. Na<sub>2</sub>EDTA and 18% Na<sub>4</sub>HEBP delivered alternately under controlled flow did not inactivate tissue-dissolution ability of NaOCl. 9% Na<sub>4</sub>HEBP reduced pulp tissue-dissolution ability of NaOCl after 2 and 5 minutes. Both chelators had a negative effect in free available chlorine of supernatant solutions; however, it was higher with Na<sub>2</sub>EDTA and associated to a rise in temperature, bubble formation and salt precipitate formation.

**Keywords:** tissue dissolution, sodium hypochlorite, NaOCl, ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, etidronate, etidronic acid, HEBP, HEDP, alternate delivery, continuous flow.

### **3. INTRODUCCIÓN**



### 3.1. GENERALIDADES.

La preparación químico-mecánica en endodoncia es imprescindible para conseguir una adecuada limpieza, desinfección y conformación del sistema de conductos radiculares, así como un posterior sellado tridimensional, lo más hermético y biológico posible (1, 2) (**Figura 1**). Para ello se requiere combinar la acción de soluciones químicas denominadas irrigantes para la limpieza y desinfección del sistema de conductos radiculares con la acción mecánica de los instrumentos (limas) para su conformación (3, 4).

**A**



**B**

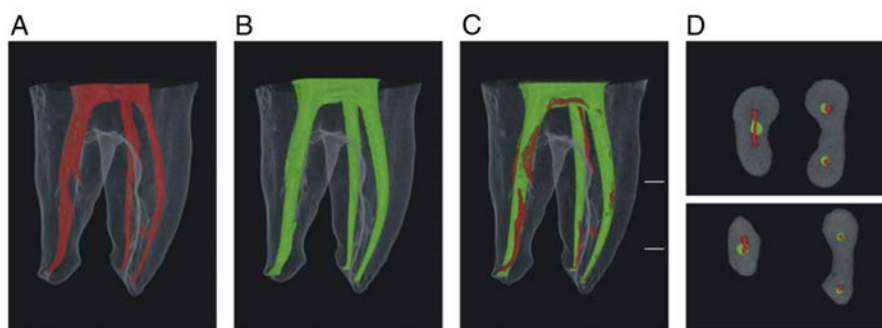


**Fig.1. (A)** Segundo premolar superior derecho (1.5) con necrosis pulpar y periodontitis apical sintomática. **(B)** Control a los 3 años de la endodoncia realizada, asintomática y con aparente curación radiográfica.

La incorporación del Níquel Titanio (NiTi) en endodoncia y el desarrollo de nuevos sistemas de instrumentación han facilitado y simplificado la conformación del sistema de conductos radiculares, disminuyendo los errores durante su preparación (5). Por un lado, se consiguen preparaciones más centradas y con un mayor respeto de la anatomía original, y por otro el menor número de instrumentos empleado hace que estas preparaciones se realicen más rápidamente (6, 7).

Además, las nuevas aleaciones y los diferentes movimientos sugeridos, tanto rotatorio continuo como recíproco, permiten una preparación cada vez más segura con un menor esfuerzo por parte del profesional (7-9).

Sin embargo, la complejidad anatómica del sistema de conductos radiculares hace que la instrumentación tenga una serie de limitaciones, ya que produce acumulación de restos dentinarios sobre las paredes (barrillo dentinario) o en zonas inaccesibles como istmos, ramificaciones e irregularidades (detritus o debris) y por sí sola no es capaz de eliminar todo el contenido de su interior (tejido pulpar vital o necrótico, microorganismos, barrillo dentinario y detritus), dejando entre un 24-64% de las paredes del conducto intactas (5, 10) (**Figura 2**).



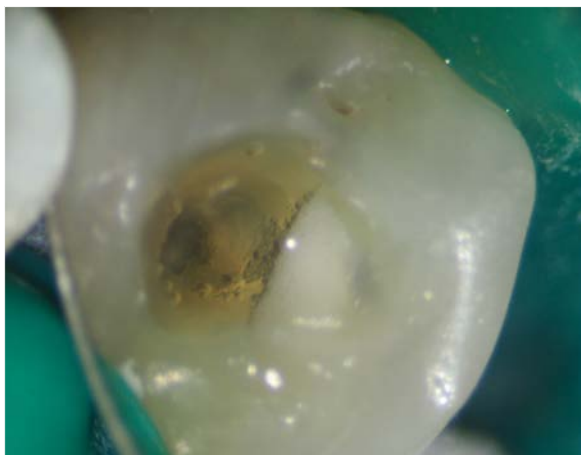
**Fig.2.** Imágenes de  $\mu\text{CT}$  de un molar inferior tomadas de Zhao y cols, 2014 (10). **(A)** Anatomía interna original del molar inferior (color rojo). **(B)** Instrumentación del sistema de conductos radiculares con Protaper Next® (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) (color verde). **(C y D)** Superposición de áreas instrumentadas (color verde) y no instrumentadas (color rojo) donde se observan áreas intactas, sobre todo en los conductos distales.

Estos restos pueden ocasionar un fracaso endodóntico por lo que es fundamental insistir en la fase de irrigación durante la instrumentación entre lima y lima y después de ella, una vez conformado definitivamente el sistema de conductos radiculares (11-13) (**Figura 3 y 4**).

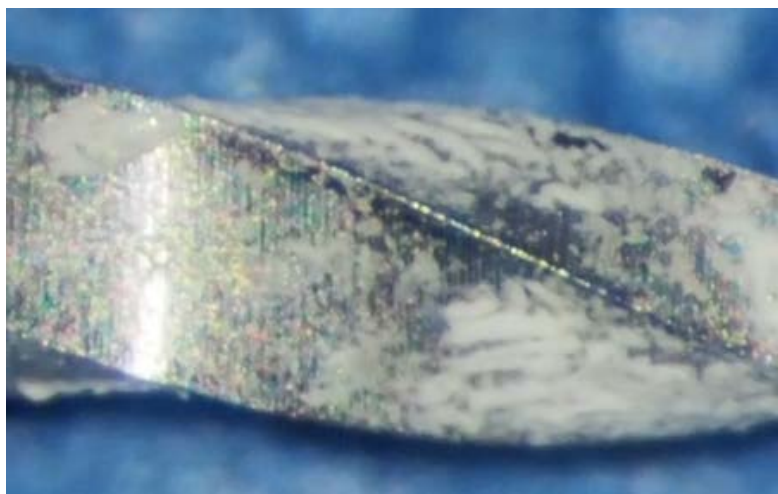
**A**



**B**



**Fig.3. (A)** Irrigación con hipoclorito de sodio en el interior del conducto mediante jeringa con la aguja doblada a longitud trabajo menos 1 mm. **(B)** Presencia de burbujas en la cámara pulpar debido a la acción del hipoclorito de sodio sobre la materia orgánica.



**Fig.4.** Detritus creados por la lima rotatoria Protaper Next® X2 (Dentstply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) tras conformar el sistema de conductos radiculares.

Así, la irrigación es un paso de vital importancia durante el tratamiento de conductos tanto para disolver y eliminar el tejido orgánico del interior del sistema de conductos (tejido pulpar y bacteriano) como el inorgánico (detritus y barrillo dentinario).

### 3.2. TIPOS DE IRRIGANTES.

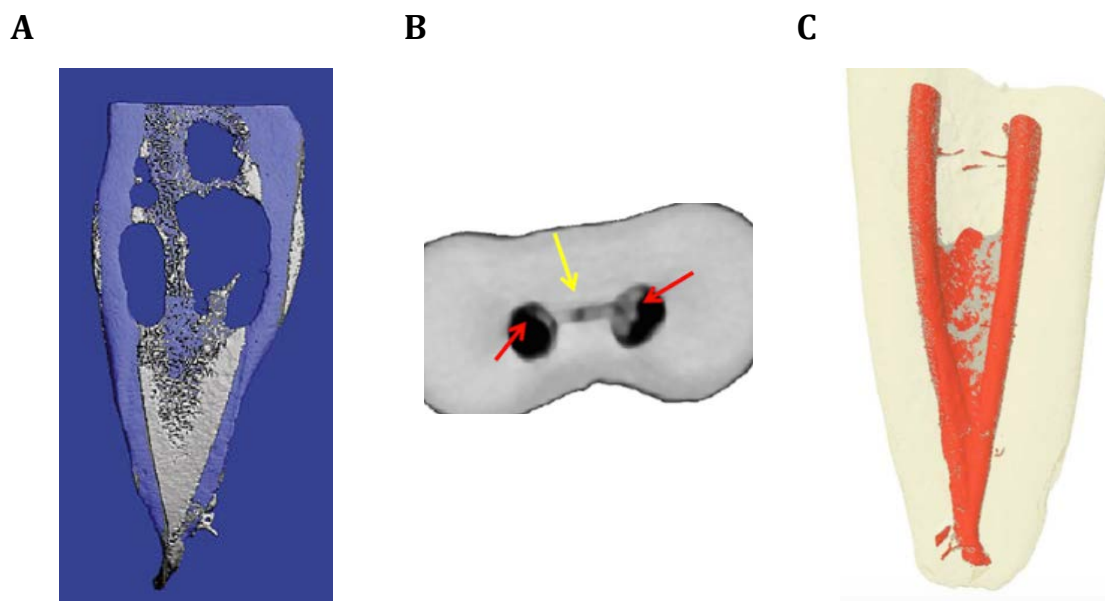
Durante el tratamiento de conductos, se emplean diferentes tipos de irrigantes puesto que no existe el irrigante ideal que aúne todas las propiedades deseables (2, 3) **(Tabla 1)**.

**Tabla 1.** Características del irrigante ideal en endodoncia (2, 3).

Características del irrigante ideal	
1. Tener capacidad antimicrobiana.	9. No tener efectos adversos sobre la dentina.
2. No irritar a los tejidos periapicales.	10. No afectar al sellado de la obturación.
3. Ser una solución estable y activa.	11. No teñir al diente.
4. Tener un efecto prolongado en el tiempo.	12. Ser biocompatible.
5. Poseer una baja tensión superficial.	13. Favorecer la curación.
6. Disolver materia orgánica.	14. No ser tóxico ni carcinogénico.
7. Eliminar materia inorgánica.	15. Poseer un manejo fácil.
8. Ser lubricante.	16. Tener un coste barato.

Los irrigantes más empleados en endodoncia son el hipoclorito de sodio ( $NaOCl$ ) para la disolución y eliminación del componente orgánico, la clorhexidina ( $CHX$ ) como agente antimicrobiano y los agentes quelantes del tipo ácido etilendiamino tetraacético ( $EDTA$ ) y el ácido cítrico ( $AC$ ) para la eliminación del componente inorgánico (3).

Si no se combina la instrumentación mecánica con la acción de un irrigante, el porcentaje de superficie cubierta por restos dentinarios es de un 30-35% mientras que este porcentaje se reduce considerablemente (hasta un 5-11%) cuando se irriga con  $NaOCl$  seguido de un agente quelante, y disminuye aún más si el irrigante se activa de forma ultrasónica, llegando a quedar solo un 4% (12-15) **(Figura 5)**.



**Fig.5.** Imágenes de  $\mu\text{CT}$  de raíces mesiales de molares inferiores tomadas de Paque y cols, 2009 (12) y De-Deus y cols, 2014 (13). **(A)** Superposición de la acumulación de restos dentinarios (área gris) al instrumentar raíces mesiales de molares inferiores con el sistema Protaper® Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) sin irrigación sobre la anatomía original de los conductos radiculares (12). **(B y C)** Presencia de restos dentinarios en el istmo y en áreas instrumentadas. Presencia de restos dentinarios después de instrumentar con lima Reciproc® R25 (VDW GMBH, Munich, Germany) con movimiento recíprocante e irrigar de forma convencional con  $\text{NaOCl}$  seguido del quelante EDTA (13).

El  $\text{NaOCl}$  es el irrigante más empleado ya que tiene efecto bactericida al inactivar las endotoxinas y disolver la materia orgánica, tanto el tejido pulpar vital o necrótico como la parte orgánica del barrillo dentinario que se forma durante la instrumentación (3).

La CHX, que es una bisguanida catiónica, se emplea por su capacidad antibacteriana para alterar la membrana citoplasmática (16-19) y su efecto prolongado (sustantividad) (20-22). Sin embargo, actualmente está en desuso por su pobre capacidad de disolución de tejido y porque es menos efectiva frente a las bacterias Gram- que el  $\text{NaOCl}$  (23-26). Además, interacciona con el  $\text{NaOCl}$  causando un precipitado naranja-marrón que tapiza las paredes dentinarias tiñendo la dentina y pudiendo afectar al sellado de la obturación, siendo controvertida la naturaleza de este precipitado (presencia o no de paracloroanilina) y su toxicidad (27-34) (**Figura 6**).



**Fig.6.** Presencia de precipitado en la pared dentinaria al mezclar el  $\text{NaOCl}$  con  $\text{CHX}$ .

Imagen tomada de Arslan y cols, 2015 (33).

Tanto el  $\text{EDTA}$  como  $\text{AC}$  son agentes quelantes usados para reblandecer la dentina y eliminar detritus y la parte inorgánica del barrillo dentinario que ocluye los túbulos dentinarios después de la instrumentación, pero no tienen la capacidad de disolver la materia orgánica (3). Se emplean principalmente en el protocolo de irrigación final, una vez conformado definitivamente el sistema de conductos (3). Yamada y cols en 1983 (35) propusieron un protocolo de irrigación estándar empleando  $\text{NaOCl}$  durante la instrumentación seguido por un protocolo de irrigación final, en el que se empleaba un agente quelante fuerte como el  $\text{EDTA}$  seguido del  $\text{NaOCl}$ , como irrigante final. Por tanto, en cualquier caso, es necesario combinar el  $\text{NaOCl}$  con un agente quelante.

Hubiera sido deseable que la evolución sufrida por la conformación de conductos radiculares, se hubiera acompañado de una similar en la irrigación y así se hubiera conseguido mayor rapidez también durante la limpieza del sistema de conductos; sin embargo, el  $\text{NaOCl}$ , irrigante de momento insustituible para la disolución de tejido orgánico, parece inactivarse cuando se mezcla con un agente quelante (3, 36-38). Por ello, se intenta buscar el irrigante que, combinado con él, no altere su capacidad de disolución de tejido orgánico y añada la capacidad de disolver tejido inorgánico.

Como alternativa a los quelantes tradicionales recientemente se ha planteado la mezcla del  $\text{NaOCl}$  con un agente quelante débil, etidronato ( $\text{HEBP}$ ), de forma combinada durante la instrumentación sin tener que recurrir a la irrigación final de un agente quelante fuerte independiente (15, 36). Estudios recientes sugieren que el  $\text{HEBP}$  no altera la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$  (39) y reduce la acumulación de restos dentinarios y la formación de barrillo dentinario durante la instrumentación (15).

Sin embargo, los estudios que han demostrado la disminución de la capacidad de disolución del NaOCl en presencia de agentes quelantes, como el EDTA (36-38), han empleado una metodología que no reproduce una situación clínica real, sumergiendo el tejido a disolver en soluciones estancas a lo largo del tiempo, sin renovación continua o empleando soluciones mezcladas.

Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo de la irrigación en endodoncia es disolver tanto la materia orgánica como la inorgánica, por lo que se hace imprescindible el uso del NaOCl y de un agente quelante. La selección del irrigante adecuado, así como el conocimiento profundo de sus propiedades químicas, efectos y posibles interacciones cuando se combinan es de suma importancia para obtener una limpieza y desinfección eficaz dentro del sistema de conductos radiculares al igual que conocer el protocolo de irrigación que hay que seguir. Asimismo, han de tenerse en cuenta los efectos indeseables que aparecen con determinadas concentraciones de los mismos, entre ellos: la toxicidad, erosión dentinaria y reducción de la microdureza dentinaria, y por tanto, la posible disminución en la resistencia a la fractura de la dentina tratada (40, 41). Por ello, como norma debería utilizarse la concentración mínima efectiva del irrigante para conseguir sus efectos deseables y minimizar los indeseables.

A continuación, pasamos a describir las soluciones irrigadores empleadas en esta tesis doctoral: el NaOCl y dos agentes quelantes, EDTA y HEBP. Se ha elegido el EDTA por ser la solución quelante más estudiada y utilizada en endodoncia para la eliminación de la materia inorgánica para poderlo comparar con el HEBP, de reciente incorporación.

### **3.2.1. Agentes disolventes de tejido orgánico: HIPOCLORITO DE SODIO o NaOCl.**

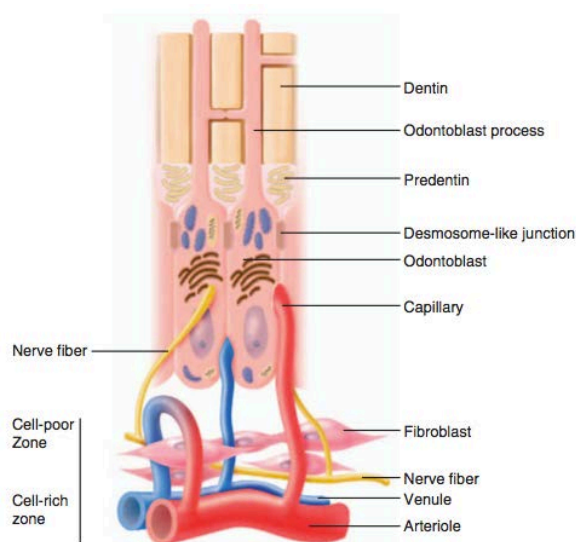
#### **a. Sustrato sobre el que actúa.**

Uno de los objetivos en la fase de irrigación es disolver el tejido orgánico del interior del sistema de conductos, siendo el **tejido pulpar humano** el principal (**Figura 7**).



**Fig.7.** Tejido pulpar humano de un conducto palatino de un segundo molar superior derecho (1.6).

Se trata de un tejido de origen mesenquimatoso con células especializadas llamadas odontoblastos (cuerpo y prolongaciones odontoblásticas), que están en íntima relación con la dentina. De ahí, el llamado complejo dentino-pulpar. Se encuentra confinado por la dentina mineralizada y está compuesto por fibras nerviosas sensoriales mielínicas tipo A ( $A\delta$  y  $A\beta$ ) y amielínicas tipo C, tejido vascular (arteriolas y vénulas), fibras de tejido conectivo, sustancia fundamental, fluido intersticial, odontoblastos, fibroblastos y células inmunocompetentes (**Figura 8**).



**Fig.8.** Composición de la pulpa humana. Imagen tomada de Hargreaves y cols, 2016 (42).

Debido a la presencia de fibras nerviosas es un órgano sensorial capaz de percibir los estímulos (42) (**Tabla 2**). Conserva su capacidad de formar dentina a lo largo de la vida y su sistema vascular disminuye progresivamente con la edad (42).

**Tabla 2.** Clasificación de las fibras nerviosas de la pulpa (42).

Fibras nerviosas			
Tipo de fibra	Función	Diámetro	Velocidad
A $\delta$ (90% fibras A)	Propiocepción	12-20 $\mu$ m	70-120 m/seg
A $\beta$	Presión, tacto	5-12 $\mu$ m	30-70 m/seg
C	Dolor, temperatura, tacto	0,4-1 $\mu$ m	0,5-2 m/seg

En la pulpa existen dos tipos de proteínas estructurales: colágeno (tipo I y III) y elastina. El colágeno es una glicoproteína rica en hidroxiprolina y en menor proporción, en hidroxilisina e hidratos de carbono (43).

Aunque en la práctica clínica el tejido a disolver es el tejido pulpar humano, los trabajos de investigación sobre capacidad de disolución de irrigantes en endodoncia emplean además del **tejido pulpar humano** (44-53), **bovino** (23, 26, 54-75) y **porcino** (76), **otro tipo de tejidos no pulpares** (24, 37, 39, 56, 77-95), como analizaremos más detalladamente en el apartado de discusión de esta tesis doctoral.

### **b. Características generales.**

El NaOCl, es un compuesto halogenado fuertemente oxidante por lo que se utiliza como desinfectante y blanqueador (96). Posee una masa molecular de 74,44 g/mol, una densidad de 1,07-1,14 g/cm<sup>3</sup> y un punto de ebullición de 101°C (97).

Su uso en odontología se inició con una mezcla de hipoclorito de sodio y potasio en 1792. En 1820, el químico francés Labarraque utilizó el NaOCl al 2,5% para la desinfección de las heridas. En 1915, durante la Primera Guerra Mundial, Dakin (98), químico americano, y el cirujano Alexis Carrell emplearon para la desinfección de las heridas de guerra la solución diluida del NaOCl al 0,5% neutralizada con ácido bórico (0,4%) a pH 11 (solución de Dakin) mejorando su cicatrización puesto que se formaba borato de sodio en la solución y no era irritante sobre los tejidos. En 1936, Walker (1) empleó 5% NaOCl como irrigante en los conductos radiculares (3, 96).

En endodoncia, el uso del  $\text{NaOCl}$  es imprescindible porque es capaz de disolver el tejido orgánico y eliminar bacterias Gram+ y Gram- y el ecosistema microbiano organizado (biofilm). Es un agente proteolítico no específico que disuelve materia orgánica -el tejido pulpar vital y necrótico- y la parte orgánica del barrillo dentinario; pero no así su parte inorgánica (4, 86, 99).

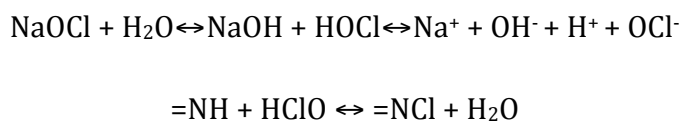
Uno de sus inconvenientes es que es muy reactivo y no es fácil combinarlo con otras sustancias que podrían atenuar sus limitaciones, como su escasa capacidad de eliminación del barrillo dentinario. Para ello es necesario el empleo de irrigantes adicionales capaces de eliminar el componente inorgánico del barrillo dentinario, como quelantes del calcio, ya sea como irrigación final (35) o de forma alternante durante el tratamiento para prevenir la acumulación del mismo durante la instrumentación (15, 100).

No solo hay que cuidar su concentración; el tiempo de acción, la temperatura, el pH y la tensión superficial juegan también un papel muy importante en su eficacia. Igualmente, y como veremos más adelante, el volumen, el área de contacto, su renovación, su forma de dispensación, su activación y las interacciones químicas cuando se combina con otros son de suma importancia para su correcto funcionamiento.

### **c. Mecanismo de acción.**

El cloro libre es el compuesto activo del  $\text{NaOCl}$ . El cloro libre tiene diferentes formas en función del pH. En la forma ácida ( $\text{pH}<4$ ) predomina el cloro gas ( $\text{Cl}_2$ ), en la forma neutra ( $\text{pH}=7$ ), el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) y en la forma alcalina ( $\text{pH}\geq 9$ ), el ión hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) (101).

El  $\text{NaOCl}$  tiene un balance dinámico que tiende a cambiar de dirección continuamente dependiendo del pH como se muestra en la siguiente fórmula (58, 98, 102):



El  $\text{NaOCl}$  en solución acuosa da lugar a hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) y ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). Posteriormente, dependiendo del pH, se disocia en iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y en iones hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ), o bien predominando el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) si la solución tiene un pH ácido (3, 102).

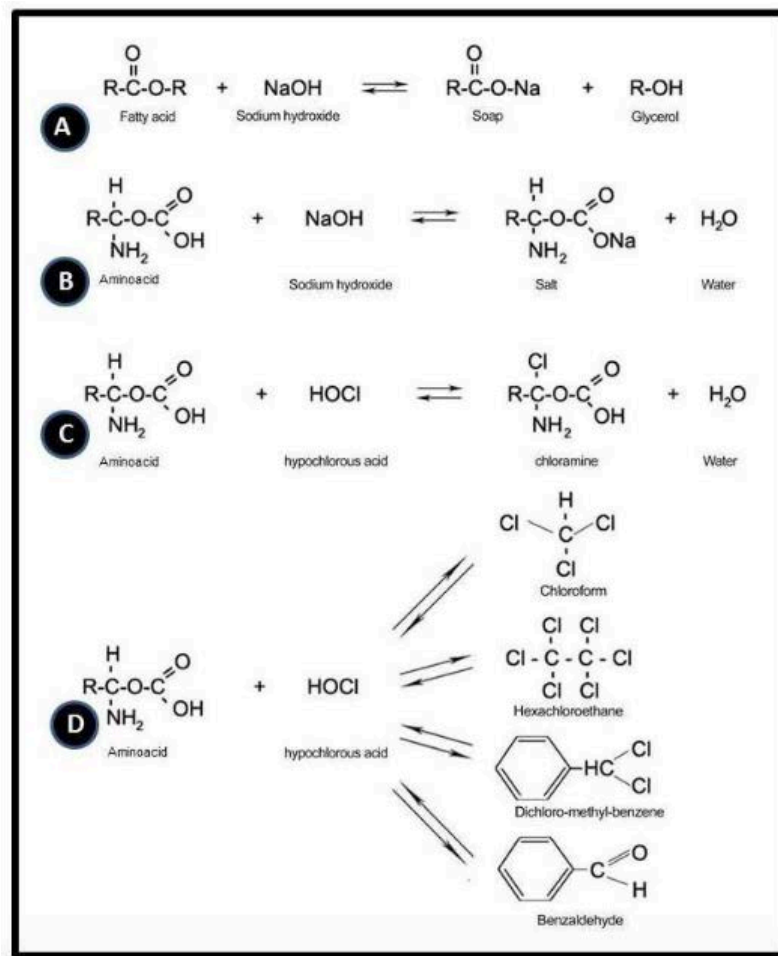
Su capacidad antimicrobiana depende del ácido hipocloroso y causa destrucción fosfolipídica y alteraciones biosintéticas en el metabolismo celular debido a la formación de cloraminas y a su acción oxidativa ya que oxida los grupos sulfidrilo de las enzimas de las bacterias (102).

Su capacidad de disolución de materia orgánica depende del ión hipoclorito, que es menos citotóxico (87, 101).

Al contactar el  $\text{NaOCl}$  con el tejido orgánico se produce una reacción de **saponificación** que degrada los ácidos grasos, que reaccionan con el hidróxido de sodio, formándose sales y glicerol (alcohol), reduciendo la tensión superficial de la solución remanente. A continuación, se produce una reacción de **neutralización**, ya que el hidróxido de sodio neutraliza ácidos aminos formando agua y sal produciéndose una reducción del pH por la salida de iones hidroxilo.

Estas dos reacciones se producen de forma simultánea y sinérgicamente conduciendo a una licuefacción del tejido orgánico. Se sigue de una reacción de **cloraminación**, en la que el  $\text{HOCl}$  en contacto con el tejido libera cloro que se une al grupo amino reemplazando el hidrógeno dando lugar a cloraminas provocando una degradación de aminoácidos y una hidrólisis interfiriendo con el metabolismo celular (58, 97, 98, 102).

También durante la disolución de tejido se forman **subproductos** como son los compuestos organoclorados (cloroformo, hexacloroetano, diclorometilbenzeno y benzaldehído) que pueden ser detectados mediante espectrometría de masas cromatografía de gases (GC-MS). La cantidad de cada compuesto es directamente proporcional a la concentración de  $\text{NaOCl}$  (97). Esto se ha demostrado durante la disolución de tejido pulpar bovino (11 mg) sumergido en 2 ml  $\text{NaOCl}$  a diferentes concentraciones (0,5%, 2,5% y 5,25%) y en contacto con la dentina (30 mg) (**Figura 9**).



**Fig.9.** Reacciones químicas en la disolución de tejido pulpar con  $\text{NaOCl}$ . **A)** Saponificación. **B)** Neutralización. **C)** Cloraminación. **D)** Subproductos generados. Imagen tomada de Varise y cols, 2014 (97).

La materia orgánica reacciona con el  $\text{NaOCl}$  dependiendo de la cantidad de  $\text{NaOCl}$  y materia orgánica siendo el efecto disolvente del  $\text{NaOCl}$  inmediato y continuo al menos durante una hora (45, 78). En los primeros minutos se tiene la mayor disolución de tejido cuando este se sumerge en una solución (78). Luego, esa disolución es más lenta llegando a agotar la solución si hay gran cantidad de materia orgánica sumergida (92). El cloro residual que queda después de disolver el tejido es directamente proporcional a la concentración inicial de  $\text{NaOCl}$  (58).

#### **d. Factores que afectan a su capacidad de disolución.**

##### **d.1. Concentración.**

El  $\text{NaOCl}$  se usa en endodoncia en concentraciones que varían entre 0,5-6% (3, 53) y no hay consenso sobre su concentración ideal.

La concentración de las soluciones comerciales de  $\text{NaOCl}$  indican el porcentaje del contenido de cloro libre (65) aunque hay que verificarlo antes de realizar un estudio sobre disolución de tejido porque en algunos estudios como por ejemplo, el de Clarkson y cols (76), todas las soluciones de  $\text{NaOCl}$  poseían un porcentaje de cloro libre más alto del que indicaba el fabricante: el 4%  $\text{NaOCl}$  presentaba 4,66 y el 1%  $\text{NaOCl}$ , 1,56.

La capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$  es directamente proporcional a su concentración: a mayor concentración, mayor capacidad de disolución de tejido orgánico; pero también mayor toxicidad (25, 53, 54, 56, 58, 67, 72, 73, 79, 80, 83, 86, 87, 93-95, 102). Sin embargo, se ha demostrado que si se emplean soluciones con concentraciones más bajas en grandes volúmenes pueden ser igual de efectivas (92, 103). Lo mismo ocurre al elevar la temperatura de las soluciones (47).

Otros autores (45, 55) en cambio no observaron mayor efectividad a mayor concentración. Trepagnier y cols (45) observaron diferencias a los 5 minutos de acción entre 5,25% y 0,5% de  $\text{NaOCl}$ , pero no entre 5,25% y 2,5%. Estos resultados se deben posiblemente a que se empleó el método indirecto de la hidroxiprolina, que representa la cantidad de colágeno disuelto en la solución, para determinar su eficacia al irrigar dientes humanos. Los resultados de Gordon y cols (55) también mostraron que el 3% y 5%  $\text{NaOCl}$  eran igual de efectivos en disolver tejido vital y necrótico.

Parece ser que la concentración del  $\text{NaOCl}$  es un factor importante en la capacidad de disolución cuando su pH se encuentra entre 9-12, pero no a pH 6. A pH entre 9 y 12, la concentración de 5,25%  $\text{NaOCl}$  es la que más tejido disuelve (87).

A mayor concentración existe una mayor velocidad de disolución, disminuyéndose el tiempo para conseguir la disolución completa (23, 58, 76) y una mayor reducción de la tensión superficial del  $\text{NaOCl}$  después de la disolución del tejido, debido posiblemente a que existe mayor cantidad de hidróxido de sodio que al actuar con los ácidos grasos produce detergente, reduciendo la tensión superficial (58).

Okino y cols (23) determinaron la velocidad de disolución de tres concentraciones diferentes de NaOCl (0,5%, 1% y 2,5%) siendo de 0,31, 0,43 y 0,55 mg/min, respectivamente. Rossi-Fedele y cols (62) obtuvieron resultados similares para una concentración del 0,5% NaOCl, observando una velocidad de dilución de 0,396 mg/min. Hand (93) sugirió que esta concentración era ineficaz para disolver tejido conectivo necrótico de rata al sumergirlo durante 7 minutos, pero Rossi-Fedele y cols (62) observaron la disolución completa de 13 mg de tejido pulpar bovino sumergido en 1,5 ml de esta solución a los 34 minutos. En cambio, en el estudio de Beltz y cols (59) no se encontraron diferencias en la capacidad de disolución de tejido pulpar bovino (aproximadamente 90%) entre 5,25% y 2,6% NaOCl a las 2 horas, debido quizás a que utilizaban tejido liofilizado, es decir, completamente deshidratado y pulverizado. En cambio, Couto de Oliveira y cols (25) encontraron que un 5,25% NaOCl disolvió a los 30 minutos casi el 98% de tejido a diferencia del 2,5% NaOCl que en ese mismo tiempo sólo disolvió el 20%. Clarkson y cols (76) obtuvieron la disolución de tejido pulpar porcino ( $\varnothing$  2,5 mm) con 1% NaOCl con o sin surfactante a los 23 minutos mientras que con una concentración más alta del 4%, el tiempo disminuyó casi a la mitad, a los 10 minutos.

Por tanto, como regla general se puede decir que a mayor concentración de NaOCl, mayor disolución y mayor velocidad de disolución.

Se ha observado también que la dilución del NaOCl afecta negativamente a su capacidad antimicrobiana (104).

#### **d.2. Tiempo de actuación y renovación de la solución.**

Aunque no hay acuerdo entre todos los autores, se ha encontrado en general que a mayor tiempo de exposición del tejido al NaOCl, hay mayor disolución de tejido orgánico (24, 56, 72, 83, 87, 94). De Almeida y cols (73) vieron que la disolución de tejido fue mayor a los 15 minutos que a los 5, aunque no encontraron diferencias significativas entre los 15 y 30 minutos cuando sumergieron tejido pulpar bovino en 2 ml de solución de NaOCl. En el estudio de Gordon y cols (55) la cantidad de tejido disuelto no cambió significativamente entre 5 y 10 minutos. Este hecho inesperado se debe probablemente a que en estos estudios las soluciones no se renovaron. Hay que tener en cuenta que cuando se sumerge el tejido en soluciones de NaOCl se produce una

disolución inmediata en los primeros 3-4 minutos, para continuar gradualmente hasta que se consume todo el cloro libre de la solución (56, 78), por lo que hay que tener cuidado cuando se analiza el efecto de las soluciones sobre tejido sumergido sin renovarlo puesto que se disminuye de forma considerable su capacidad de disolución. Por ello, el tiempo de disolución de tejido es mayor cuando las soluciones no se renuevan (24, 59, 86). Lo mismo ocurre cuando las soluciones están diluidas (76).

Se ha demostrado que la capacidad de disolución del NaOCl mejora con un recambio continuo (53, 58, 80) **(Tabla 3)**. A continuación, se exponen en la siguiente tabla los estudios en los que la solución fue refrescada o bien porque se sumergió el tejido y fue renovada cada cierto tiempo o se realizó un flujo continuo o intermitente.

**Tabla 3.** Estudios de disolución de tejido en los que se renueva la solución.

Autores	Solución	Renovación
Hasselgren y cols 1988 (85)	0,5% NaOCl	Cada 30 minutos
Morgan y cols 1991 (57)	2,6% NaOCl	Cada 3 minutos
Spano y cols 2001 (58)	0,5%; 1%; 2,5%; 5% NaOCl	Flujo continuo 64 ml/min
Al-Jadaa y cols 2009 (63, 64)	2,5% NaOCl	Flujo intermitente Entre activación
Cobankara y cols 2010 (66)	5,25% NaOCl	Cada 2 minutos
Malentacca y cols 2012 (69)	5,25% NaOCl	Flujo continuo/intermitente 10 ml/min
De-Deus y cols 2013 (50)	5,25% NaOCl	Flujo continuo 3 ml/min
Haapasalo y cols 2014 (80)	0,5%; 3%, 6% NaOCl	Flujo continuo 45 ml/min o 10 ml/min
Cullen y cols 2015 (53)	0,5%; 2%; 4,125%; 6%; 8,25% NaOCl	Cada 6 minutos
Tartari y cols 2017 (84)	2,5% NaOCl, 5% NaOCl+EDTA	Cada 5 minutos
Estévez y cols 2017 (90) Conde y cols 2017 (89)	6% NaOCl y 17% EDTA	Flujo intermitente 6 ml/min

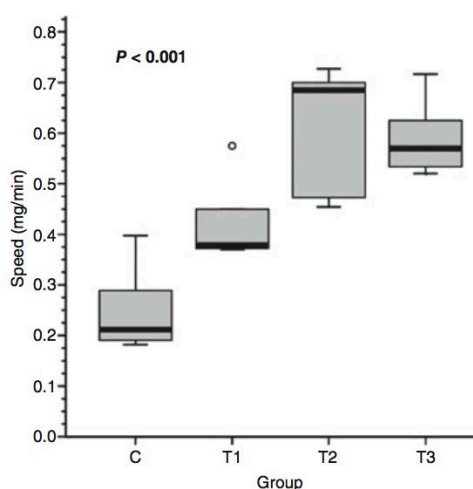
Existen muchos estudios en los que el tejido se sumerge en la solución y esta no es renovada (24, 39, 67, 75-77, 91). Otros sumergen el tejido y la solución es refrescada cada cierto tiempo (39, 53, 57, 66, 85). Y en otros se dispensa el irrigante de forma continua o intermitente alternando la instrumentación o la activación en el protocolo de irrigación final como sucede en la práctica clínica (44, 46, 50, 58, 63, 64, 69, 80, 89, 90).

Se debe emplear más tiempo para asegurar una renovación continua del  $\text{NaOCl}$  en el protocolo de irrigación final cuando el conducto ya esté completamente conformado ya que se ha reducido el tiempo de instrumentación, el cloro libre del  $\text{NaOCl}$  se agota mientras va disolviendo tejido y las soluciones diluidas son menos eficaces a igual tiempo.

### d.3. Temperatura.

Se ha observado en numerosos estudios que el aumento de la temperatura de las soluciones de  $\text{NaOCl}$  incrementa su eficacia en la capacidad de disolución de tejido (47, 56, 61, 79, 80, 82, 94, 95) y en la eliminación de la parte orgánica de los restos dentinarios (105). Sin embargo, las altas temperaturas afectan de forma negativa a su estabilidad química (106).

A igual concentración de  $\text{NaOCl}$ , el aumento de temperatura a  $45^\circ\text{C}$  incrementa la velocidad de disolución del  $\text{NaOCl}$ , no así en temperaturas mayores a  $60^\circ\text{C}$  ya que a esta temperatura se alcanza una meseta en cuanto a la disolución de tejido (61) (**Figura 10**).



**Fig.10.** Velocidad de disolución de 4%  $\text{NaOCl}$  a diferentes temperaturas (C- $20^\circ\text{C}$ , T1- $45^\circ\text{C}$ , T2- $60^\circ\text{C}$  y T3- $75^\circ\text{C}$ ). Imagen tomada de Rossi-Fedele y cols, 2008 (61).

Asimismo, algunos estudios han observado que el aumento de la temperatura puede compensar concentraciones bajas del  $\text{NaOCl}$ , entre ellos:

- 2,6%  $\text{NaOCl}$  a 37°C fue igual de efectivo que 5,2%  $\text{NaOCl}$  a temperatura ambiente (78).
- La capacidad de disolución del 1%  $\text{NaOCl}$  a 45°C sobre el tejido pulpar humano fue igual de eficaz que la del 5,25%  $\text{NaOCl}$  a 20°C. A la misma concentración (1%) fue más efectiva la que se utilizó a mayor temperatura (60°C) (47).
- Se obtuvo el mismo rango de disolución de matriz de colágeno para el 5%  $\text{NaOCl}$  a 20°C, 4%  $\text{NaOCl}$  a 20,8°C, 3%  $\text{NaOCl}$  a 23,5°C, 2%  $\text{NaOCl}$  a 26,9°C y 1%  $\text{NaOCl}$  a 36°C cuando no se renovaron las soluciones y se utilizaron con agitación continua (107).

En cambio Nakamura y cols (56) demostraron que el 10%  $\text{NaOCl}$  a 37°C era más eficaz en disolver el tejido que las concentraciones del 5% y 2% a la misma temperatura pero sin mostrar dichas concentraciones diferencias significativas a diferentes temperaturas (4°C, 22°C y 37°C).

Se ha observado también la degradación que sufre el  $\text{NaOCl}$  calentado a 37°C durante mucho tiempo (24 horas). Aunque el contenido de cloro libre se mantuvo estable durante 4 horas, a las 24 horas se redujo según su concentración: un 9,5% para el  $\text{NaOCl}$  al 5% y el 4% para el  $\text{NaOCl}$  al 2,5%. Por este motivo, se recomienda no calentarlo durante largos periodos de tiempo (78).

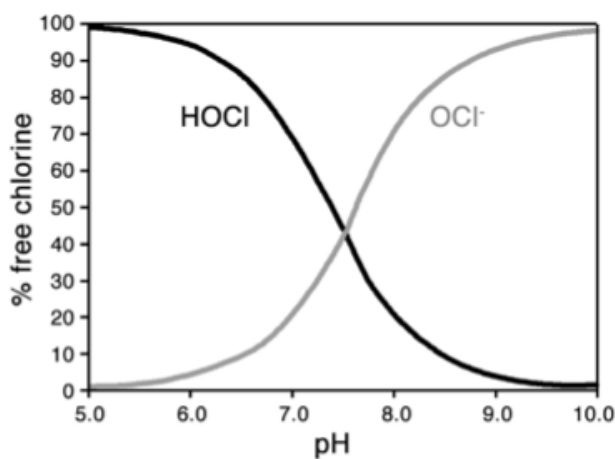
El estudio de Cunningham y Balekjian (78) es el único que determinó la temperatura intraconducto *in vivo*, de entre 31 y 33,5°C, pero no especificaron la metodología seguida ya que este no era el objetivo de su investigación. Recientemente, de Hemptinne y cols (108) midieron *in vivo* la temperatura de las soluciones dentro del conducto durante el tratamiento de conductos comprobando las diferencias de las temperaturas entre las soluciones inyectadas a temperatura ambiente o precalentadas. Las soluciones precalentadas presentaron un rápido descenso de la temperatura por lo que cuestionan el precalentamiento de concentraciones bajas de  $\text{NaOCl}$ . En contraste, las concentraciones de  $\text{NaOCl}$  inyectadas a temperatura ambiente aumentaron su temperatura (15°C) debido a la temperatura corporal siendo en este estudio la

temperatura media intraconducto algo superior ( $35,1^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ ) a la que obtuvieron los autores anteriores (78).

#### d.4. pH.

El pH de la solución de  $\text{NaOCl}$  influye en sus efectos biológicos; es decir, en su capacidad de disolución y su efecto antimicrobiano. A mayor pH, mayor disolución de tejido (87) pero si se reduce el pH entre 6 y 7,5, aumenta su eficacia antimicrobiana disminuyendo su capacidad de disolución (109).

La forma del cloro libre de la solución de  $\text{NaOCl}$  depende de su pH (como ya se vio anteriormente). A temperatura ambiente, el pKa del ácido hipocloroso es 7,5. Con lo que a ese pH hay la misma cantidad de  $\text{HOCl}$  y  $\text{OCl}^-$  en la solución de  $\text{NaOCl}$  (**Figura 11**).



**Fig.11.** Representación gráfica de la forma del cloro libre en función del pH del  $\text{NaOCl}$  tomada de Baker, 1959 (110).

En soluciones alcalinas (pH mayor de 7,5), predomina el ión hipoclorito, que tiene un alto poder oxidativo y tiene mayor poder de disolución que el ácido hipocloroso. Además, la solución es más estable y tiene una vida útil mayor porque sufre una pérdida de cloro libre más lenta (3, 110). En cambio, el ácido hipocloroso es más abundante en soluciones ácidas ( $3 < \text{pH} < 7,5$ ) y tiene mayor poder antimicrobiano (80-100 veces mayor que el ión hipoclorito) probablemente porque la molécula es más pequeña y puede penetrar fácilmente en la membrana bacteriana (87, 88, 109, 111). Al bajar el pH a 4-5, una cantidad de  $\text{HOCl}$  disminuye y aumenta el cloro gas, que es inestable por su volatilidad (112).

Se ha propuesto como pH ideal 6 para una óptima desinfección porque presenta una concentración adecuada de  $\text{HOCl}$ ; a pH 7, el 78% de cloro libre es  $\text{HOCl}$  y a pH 8, desciende al 26% (109). Se ha demostrado un incremento en la capacidad antimicrobiana contra el *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares infectados artificialmente cuando se baja el pH del 4,2%  $\text{NaOCl}$  a 6,5 y 7,5 (113).

Las soluciones de  $\text{NaOCl}$  comerciales inalteradas tienen un pH alcalino entre 11,5 y 12,5, dependiendo de su concentración, que desciende en contacto con el tejido (88). A veces, los fabricantes añaden hidróxido de sodio (soluciones modificadas) para aumentar su vida útil, pero esto puede disminuir la capacidad de disolución por lo que no se recomienda hacer la neutralización en soluciones demasiado ácidas y con concentraciones bajas (65). En el estudio de Camps y cols (65) donde se compararon dos concentraciones iguales de  $\text{NaOCl}$  al 2,5% modificada y no modificada presentaron la misma eficacia en la disolución de tejido pulpar bovino en los primeros 5 minutos con una pérdida de peso del 31% en la neutralizada y del 40 % en la no modificada; pero esta era más efectiva después porque su pérdida de cloro libre era más lenta a lo largo del tiempo siendo la solución modificada la que presentó mayor capacidad antibacteriana. A diferencia de Jungbluth y cols (88), el pH de las soluciones se mantuvo estable durante 20 minutos a pesar de la presencia de la pulpa.

En el estudio de Jungbluth y cols (88) observaron que el 5%  $\text{NaOCl}$  estabilizado con una base neutra como el hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) disolvió significativamente más tejido (mucosa de paladar porcino) que su estándar con el mismo contenido de cloro libre y su pH se mantenía constante, mientras que el de la solución de  $\text{NaOCl}$  estándar descendía de 12,5 a 7,9. Esto puede ser debido a que el paso de  $\text{OCl}^-$  a  $\text{HOCl}$  fue contrarrestado al añadir  $\text{NaOH}$  (alcalino) a la solución. Sin embargo, parece que tenía un efecto negativo sobre la dentina puesto que se obtuvieron valores en el módulo de elasticidad y en la resistencia flexural más bajos, aunque las diferencias no fueron significativas.

A pH 12 y 9 existen diferencias significativas entre la capacidad de disolución del 5,25% y 2,6%  $\text{NaOCl}$ , disolviendo más tejido la mayor concentración de  $\text{NaOCl}$  mientras que cuando desciende el pH a 6, no hay diferencias en la disolución de tejido entre las dos concentraciones. A igual concentración de  $\text{NaOCl}$  (5,25%) pero distinto pH, no

existen entre pH 12 y 9 diferencias significativas en la disolución de tejido, pero sí a pH 6, siendo la disolución de tejido menor y necesitando de más tiempo (87).

En el estudio de Zehnder y cols (86), donde se estudiaba la capacidad de disolución de soluciones de NaOCl tamponadas o no sobre la mucosa de paladar porcino, se observó que el pH de las soluciones no tamponadas de 0,5%NaOCl caía de 12 a 10,5 después de 120 min de disolución de tejido. Mientras que el pH de las soluciones tamponadas 0,5% NaOCl y del 2,5% NaOCl no tamponada se mantenía estable. Parece que no tiene ningún beneficio estabilizar el pH de las soluciones de NaOCl con bicarbonato de sodio en la disolución de tejido según el método de Dakin (86).

El pH inicial de las soluciones de NaOCl disminuye después de disolver el tejido debido a la interacción del NaOH y ácido hipocloroso con la materia orgánica por la reacción de saponificación y neutralización siendo la reducción del pH inversamente proporcional a la concentración del NaOCl (58).

Por tanto, hay que tener en cuenta el pH de la solución de hipoclorito y la presencia en su fórmula de cloruro de sodio como también de carbonatos e iones clorato ya que el contenido de NaClO<sub>3</sub> es importante porque es registrado como cloro activo en el método de titración yodométrica, sin tener capacidad de disolver tejido (114). Por tanto, cuando se usa este método, el contenido de clorato en las soluciones de hipoclorito produciría una medida falsa del contenido de cloro activo para la disolución de tejido y su efectividad antibacteriana.

#### **d.5. Tensión superficial y surfactantes.**

El NaOCl tiene una alta tensión superficial (48,90 mJ/m<sup>2</sup>) (115, 116) que limita su poder de penetración en las irregularidades del sistema de conductos (72, 79). Por eso algunos fabricantes añaden a las soluciones desinfectantes surfactantes o detergentes para disminuir su tensión superficial y aumentar su humectabilidad permitiendo una mejor penetración en los túbulos dentinarios y mejorando su efecto antibacteriano (117, 118).

En cuanto a la capacidad de disolución, Cameron (119) en 1986 mostró por primera vez que añadir un surfactante al NaOCl mejoraba su capacidad para disolver la materia orgánica, pero estos resultados difieren dependiendo de los estudios.

En los estudios de Clarkson y cols (76), Jungbluth y cols (68), De Deus y cols (50) y Niewierowski y cols (74) el surfactante no mejoró la capacidad de disolución de tejido del  $\text{NaOCl}$  a diferencia de Stojicic y cols (79), de Almeida y cols (72), Clarkson y cols en un estudio anterior (120), Estévez y cols (90) o Peña y cols (91). Esto puede deberse a la variación del contenido de cloro activo y de clorato de sodio ( $\text{NaClO}_3$ ), pH de la solución, tipo y cantidad de surfactante, tiempo de exposición, tejido a disolver y tipo de dispensación del irrigante.

En el estudio de Almeida y cols (72) la combinación del hipoclorito de sodio con surfactantes (cetrimida y propilenglicol) incrementó la capacidad de disolución de tejido pulpar bovino. Para ello, sumergieron muestras de tejido pulpar bovino de 45 mg en 2 ml de solución de  $\text{NaOCl}$  con o sin surfactante durante 5, 15 y 30 minutos y se calculó el porcentaje de pérdida de peso a lo largo del tiempo. Lo mismo ocurrió en el estudio de Stojicic y cols (79) o Clarkson y cols (120) donde el  $\text{NaOCl}$  con surfactante disolvió más tejido pulpar porcino que sin surfactante a la misma concentración. En cambio, hay otros autores que observaron que el surfactante no mejoraba la disolución de tejido pulpar humano del  $\text{NaOCl}$  en dientes extraídos vitales con conductos ovales mediante cortes histológicos en la zona apical (50), de diferentes tipos de hipoclorito de uso doméstico y de uso endodóntico sobre tejido pulpar bovino (68) o porcino (76).

Recientemente, Estévez y cols (90) observaron que la incorporación de surfactante a la solución del 6%  $\text{NaOCl}$  aumentó la disolución de tejido de mucosa porcina (3-6 mg) en ranuras artificiales simuladas en el interior de conductos radiculares previamente instrumentados. Estas diferencias con respecto al estudio De Deus y cols (50) se deben a la metodología ya que Estévez y cols (90) emplearon menor cantidad de volumen de solución y tiempo de exposición puesto que sólo estudiaban la capacidad de disolución del protocolo de irrigación final ya que previamente tuvieron que instrumentar los conductos de dientes humanos unirradiculares para introducir el tejido de mucosa palatina en las ranuras confeccionadas. Con lo que en el estudio de De Deus y cols (50) se podría haber compensado el efecto del surfactante con el volumen y el tiempo empleado de la solución.

También Peña y cols (91) mostraron que la mezcla del  $\text{NaOCl}$  con el *Keratobacter*, que contiene 29% de ácido glicólico y surfactantes, entre los que destaca el cloruro de benzalconio, mejoraba la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$ .

Podemos concluir así que la presencia de surfactante es controvertida a la hora de mejorar la capacidad de disolución del NaOCl.

En cuanto al cloro libre de este tipo de soluciones se ha observado que su pérdida es más rápida en presencia de surfactante y la solución es más inestable. En cambio, los cambios de pH y viscosidad que se producen en estas soluciones son menores a diferencia de la tensión superficial que disminuye de manera significativa. Además, hay un descenso de dicho cloro libre a lo largo del tiempo de almacenaje, siendo inicialmente de forma rápida y luego, más gradual (117).

En el estudio de Spanó y cols (58) se midió la tensión superficial de las soluciones de NaOCl antes y después de la disolución del tejido pulpar bovino mediante flujo continuo y concluyeron que existía una relación directamente proporcional entre la reducción de la tensión superficial y la concentración. Las soluciones más concentradas presentaban menor tensión superficial en la solución final.

#### **d.6. Tipo de NaOCl y condiciones de almacenamiento.**

Para que el NaOCl tenga una vida útil adecuada es necesario un almacenamiento correcto.

En primer lugar hay que tener en cuenta que en las soluciones de NaOCl tienen unas **concentraciones** sumamente variables, que no aparecen específicamente detalladas en la etiqueta, y son menos fiables que las soluciones comercializadas para uso endodóntico porque su contenido de cloro libre es impredecible (121). Además, las concentraciones altas de NaOCl (5,25%) son más estables a lo largo de tiempo, habiéndose sugerido una estabilidad de entre un mes o mes y medio (77, 88) a diferencia de las soluciones diluidas (2,6% y 1%), las cuales disminuyen su capacidad de disolución a partir de la segunda semana (77). Por este motivo, si se emplean soluciones diluidas, la dilución debería realizarse en el momento de su uso. En el estudio de van der Waal y cols (121) no encontraron esas diferencias en la estabilidad según su concentración, logrando un almacenamiento estable durante 5 meses con una reducción del cloro libre del 5%.

Varios autores han observado que tanto la **temperatura**, el **tiempo** como las condiciones del **lugar de almacenamiento** afectan a la estabilidad del NaOCl en función de la concentración y pH. Entre ellos:

Piskin and Turkun (122) observaron que las soluciones domésticas de 5% NaOCl almacenadas a 24°C presentaban significativamente mayores pérdidas de cloro libre que aquellas domésticas que se almacenaron a 4°C, con las que no hubo diferencias entre las concentraciones del 5% y 0,5%. Todas sufrieron una degradación muy lenta a lo largo del tiempo (200 días) excepto las soluciones del 5% NaOCl a 24°C, en las que además la degradación era mayor cuando el pH de las soluciones descendía.

Pécora y cols (123) evaluaron la temperatura, tiempo y forma de almacenamiento de soluciones de 5% NaOCl observando que la forma de almacenamiento de las soluciones afectaba a su degradación, por lo que recomendaron protegerlas de la exposición de la luz. Al igual que otros autores (117, 122), coinciden que la pérdida de cloro libre era directamente proporcional al tiempo de conservación.

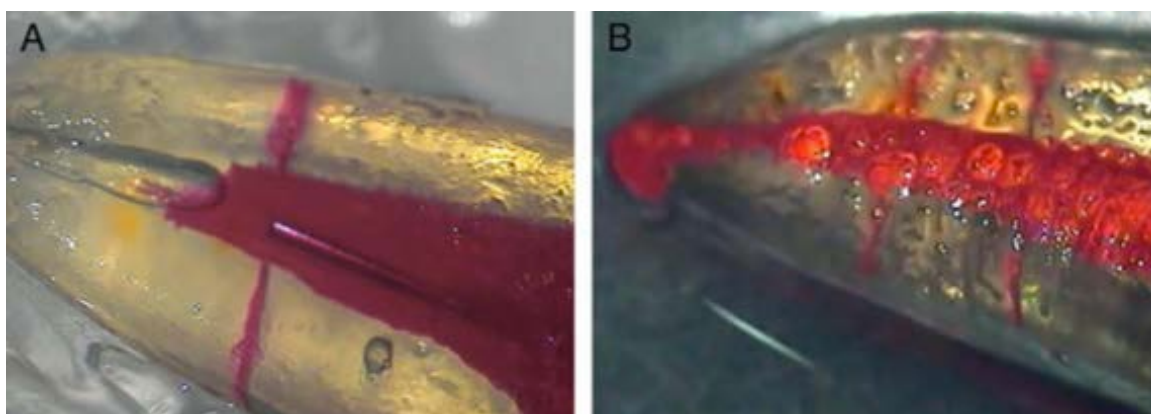
En el estudio de Pécora y cols (123) la solución se mantuvo estable 30 días; también en el estudio de Gambarini y cols (106), para luego ir disminuyendo hasta los 510 días. Pero ambos estudios discrepan en cuanto a las condiciones de temperatura. Pécora y cols (123) concluyeron que la pérdida de cloro libre era independiente de la temperatura (en su caso, temperatura ambiente o refrigerado a 9°C) y Gambarini y cols (106) no observaron diferencias significativas si las soluciones de NaOCl eran o no calentadas a 50°C en cuanto a contenido de cloro libre, densidad y pH; aunque sufrieron una degradación mínima y gradual con el tiempo y una media de pérdida de cloro libre menor al 1%. Las soluciones se mostraron estables una vez abiertas las botellas y mantenidas a temperatura ambiente durante 30 días; por lo que, según este estudio, calentar el NaOCl a 50°C no tendría efecto sobre su estabilidad. A su vez, el pH descendió gradualmente a lo largo del tiempo por la pérdida de cloro y la densidad tendió a aumentar. En cambio, Cunningham y cols (78) reportaron un deterioro en las soluciones calentadas a 37°C a las 24 horas y en el estudio de Sirtes y cols (47) las soluciones de diferentes concentraciones de NaOCl (1%, 2,62 y 5,25%) se mantuvieron estables con el 100% de contenido de cloro libre a diferentes temperaturas (20°C, 45°C y 60°C) durante 60 minutos.

Camps y cols (65) valoraron la vida útil de la solución del 2,5%  $\text{NaOCl}$  neutralizada con hidróxido de sodio a pH 7,3 a lo largo del tiempo y encontraron un descenso del porcentaje del cloro libre, situándose al 93% en una hora, 72% después de 2 horas, 52% a las 3 horas y 29% a las 4 horas. El pH también sufrió un descenso del 7,3 al 4,9 después de 5 horas. El autor aconseja usarlo dentro de las dos primeras horas, aunque puede ser compensado con la renovación de la solución.

Johnson y cols (77) recomendaban en su estudio emplear soluciones frescas y bien conservadas en botes opacos bien cerrados y a temperaturas no demasiado altas.

#### **d.7. Dispensación y activación del irrigante.**

Los irrigantes son generalmente dispensados mediante **presión positiva** (aguja conectada a una jeringa) en el interior del conducto; sin embargo, esta dispensación tiene sus limitaciones en cuanto a la penetración del irrigante a lo largo del conducto y en sentido transversal, a través de los túbulos dentinarios y a la presión ejercida en el interior del conducto (124). Al estar el diente rodeado por ligamento periodontal se comporta como un sistema cerrado dando lugar al atrapamiento de aire, o *vapor lock*, en el tercio apical (125) (**Figura 12**).



**Fig.12. (A)** Presencia de vapor lock al dispensar el irrigante con presión positiva en dientes transparentizados. **(B)** Penetración del irrigante en los conductos laterales gracias a la activación ultrasónica (125). Fotos cedidas por el Dr. César de Gregorio.

Por ello y para que la irrigación sea más efectiva se ha recomendado activar el irrigante con diferentes sistemas cuando se ha terminado la preparación mecánica del sistema de conductos radiculares.

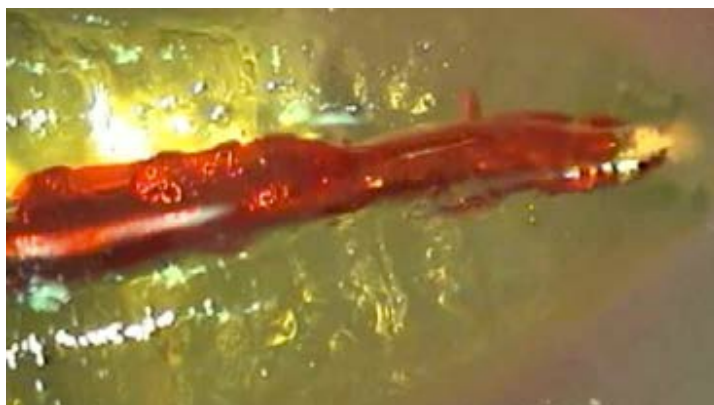
En general, la activación del  $\text{NaOCl}$  mejora su capacidad de disolución (63, 64, 70, 71, 74, 79, 82, 89, 90, 92, 126) y el efecto de la agitación mecánica depende tanto de la frecuencia como de la intensidad de la activación (92). Aunque la activación del irrigante no es objeto de esta tesis doctoral, es necesario referir ciertos conocimientos aceptados por la literatura científica para el entendimiento completo de su efecto sobre la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$ . Entre los métodos más destacados figuran: la agitación dinámica manual con cono de gutapercha, y la activación ultrasónica o sónica.

La **agitación dinámica manual** consiste en el movimiento vertical de un cono de gutapercha (3,3 Hz, 100 movimientos/30 segundos) ajustado a la preparación del conducto que genera cambios de presión en el interior de él sin afectar las paredes dentinarias (127).

La **activación ultrasónica** ejerce por un lado un efecto físico sobre el irrigante, ya que el flujo de la solución se dirige en diferentes direcciones como resultado de la transmisión acústica (*acoustic streaming*) y la cavitación, y un efecto químico al aumentar la temperatura del irrigante (128). Esta activación ultrasónica se considera pasiva porque la punta ultrasónica que oscila a 25-30 kHz no instrumenta las paredes del conducto (128).

La **activación sónica** trabaja a una frecuencia menor (1-6 kHz) que la activación ultrasónica pero la vibración de la punta de polímero (10.000 ciclos por minuto) y los movimientos de entrada y salida del conducto generan un efecto hidrodinámico sobre el irrigante (127).

Alternativamente, ha surgido también otra forma de dispensar, no de activar, el irrigante en el interior del conducto para solventar los inconvenientes de la presión positiva (124), como es el sistema de **presión negativa**, Endovac® (Kerr Dental), que favorece la penetración longitudinal del irrigante a lo largo del conducto alcanzando el tercio apical sin extrusión apical, evitando el *vapor lock* y permitiendo un flujo constante del irrigante logrando una renovación continua de este y aumentando el volumen total del irrigante utilizado (129) (**Figura 13**).



**Fig.13.** Penetración longitudinal del irrigante a lo largo del conducto en diente transparentizado mediante sistema de presión negativa Endovac® (129). Fotos cedidas por el Dr. César de Gregorio.

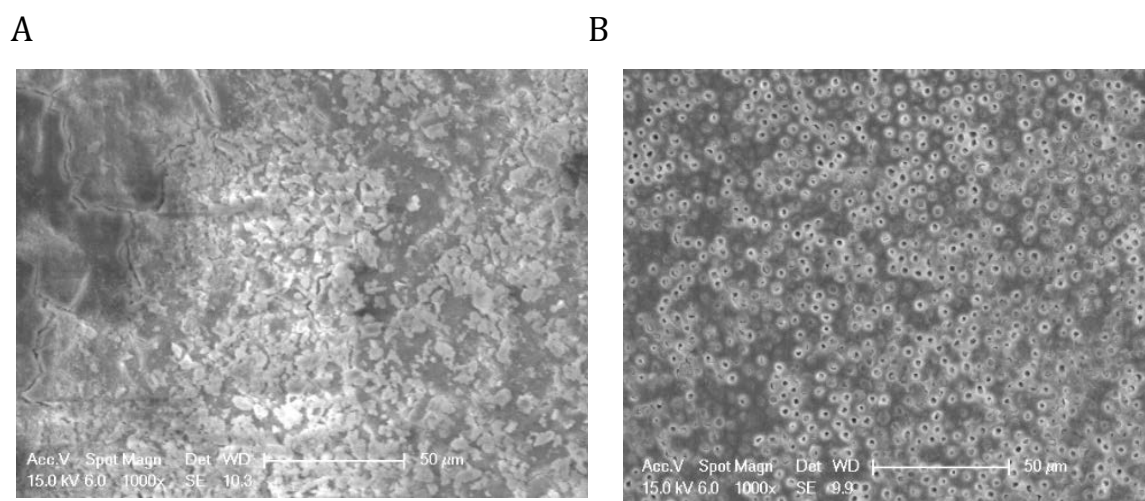
Existen también otros sistemas menos extendidos como el láser Er-YAG, la activación fotoacústica inducida por fotones (PIPS), la activación microeléctrica y el sistema Multisonic Ultracleaning® (Gentle Wave, Sonendo Inc, Laguna Hills, CA) que parecen mejorar la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$  (71, 80-82, 130).

### **3.2.2. Agentes disolventes de tejido inorgánico: quelantes.**

#### **a. Sustrato sobre el que actúan.**

Mc Comb y Smith (131) demostraron en 1975 por primera vez la presencia del **barrillo dentinario** o *smear layer* en raíces instrumentadas. Se trata de una capa amorfa irregular compuesta por predentina, dentina, restos pulpares, procesos odontoblásticos, restos de irrigante y bacterias y productos metabólicos; por tanto, de materia orgánica e inorgánica (35, 131-133). El espesor de la capa superficial de barrillo dentinario que tapiza los túbulos dentinarios oscila entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  y el de la capa más profunda que penetra dentro de los túbulos dentinarios, entre 6 y 40  $\mu\text{m}$  (132). Su eliminación permite una mejor desinfección de las paredes dentinarias en primer lugar porque en esta capa de detritus pueden existir restos de bacterias, y en segundo porque su eliminación mejora la penetración de los irrigantes y medicamentos. Además, su eliminación permite la mayor penetración, adaptación marginal y calidad del sellado de los materiales de obturación previniendo su microfiltración y posterior recontaminación

(41, 133-135). Por tanto, su remoción antes de realizar la obturación del sistema de conductos radiculares favorece el éxito del tratamiento de conductos (41, 133-136) pero hay que tener en cuenta que la eliminación del barrillo dentinario en el tercio apical es limitada existiendo diferencias entre los quelantes que se empleen y cómo se dispensen (137-139) (**Figura 14**).



**Fig.14. (A)** Pared dentinaria recubierta por barrillo dentinario después de la instrumentación. **(B)** Eliminación del barrillo dentinario con un agente quelante. Fotos cedidas por la Dra. Laura Rius.

### **b. Características generales y mecanismos de acción.**

Estas sustancias son usadas por su acción quelante sobre los iones calcio presentes en los cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{OH}$ ) modificando la proporción calcio/fósforo, siendo el principal componente inorgánico de la dentina, pero también pueden ser alterados otros elementos de su contenido mineral como el magnesio, sodio, sulfuro, manganeso y zinc, lo que puede influir en las propiedades físicas y mecánicas de la dentina (140).

La eliminación del barrillo dentinario se realiza con agentes quelantes, ya que el  $\text{NaOCl}$  por sí sólo no es capaz de eliminar el barrillo dentinario que se genera durante la instrumentación (4, 35).

Al mismo tiempo, los agentes quelantes poseen una capacidad antimicrobiana muy baja y no tienen capacidad para disolver la materia orgánica del barrillo dentinario, solo la materia inorgánica (136). Por ello, en la eliminación del barrillo dentinario se

emplea también  $\text{NaOCl}$  (4, 35). Además, el  $\text{NaOCl}$  como irrigante final degrada más rápidamente el colágeno de la dentina que ha quedado expuesto tras la acción del agente quelante, reduciéndose así el número de bacterias y biofilms que se adhieren a esa dentina tratada (141).

### **c. Tipos de quelantes.**

Los quelantes se pueden clasificar según su efecto descalcificante sobre la dentina a lo largo del tiempo en quelantes fuertes o débiles. Nos centraremos en los que hemos empleado en esta tesis doctoral.

#### **c.1. Quelantes fuertes: EDTA.**

Es el quelante endodóntico por excelencia dentro de los agentes fuertes.

El EDTA es un ácido poliaminocarboxílico  $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}_2)]_2$ . Tiene afinidad por iones metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en los cristales de la hidroxiapatita, por lo que elimina la parte inorgánica del barrillo dentinario alterando las propiedades de la dentina. Tiene un efecto autolimitante debido a la acificación de la solución. Esta disminución del pH de la solución es debida a que se producen a la vez una quelación (captación de iones calcio) y una protonación (liberación de iones hidrógeno) (142). Además, contribuye a la eliminación de bacterias, aunque su poder antimicrobiano es bajo (136) pero presenta como desventaja que no tiene capacidad de disolución de tejido (39, 54, 136, 143); aunque en el estudio de Beltz y cols (59), el EDTA disolvió el 51,5% de tejido pulpar bovino liofilizado y el 70% de dentina en 2 horas y a  $37^\circ\text{C}$ . Esto pudo ser debido al tipo de tejido empleado, que estaba deshidratado y liofilizado.

Realmente no se emplea el ácido sino la sal del mismo. Esta sal del EDTA puede presentarse según su composición química de diferentes formas: disódica ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), trisódica ( $\text{Na}_3\text{EDTA}$ ) y tetrasódica ( $\text{Na}_4\text{EDTA}$ ), según su pH. La forma tetrasódica del EDTA ( $\text{Na}_4\text{EDTA}$ ) se considera un quelante débil porque necesita de más tiempo para eliminar el barrillo dentinario (144).

El EDTA puede ser empleado de dos formas: líquido o en forma de pastas, en las que se combina por ejemplo el EDTA con peróxido de urea (RC-Prep™) (136). En este estudio, nos vamos a centrar en el EDTA líquido, que es el que se emplea generalmente para la eliminación del barrillo dentinario (3). El EDTA líquido es usado normalmente a una concentración del 17% durante 1-2 minutos y es capaz de desmineralizar unas 50 µm (136).

### **c.2. Quelantes débiles: etidronato (HEBP).**

Los agentes quelantes débiles como la sal tetrasódica del EDTA (Na<sub>4</sub>EDTA) y el etidronato (HEBP) causan una desmineralización menor con pocas alteraciones en la estructura dentinaria necesitando más tiempo para eliminar el barrillo dentinario (aproximadamente 5 minutos) (36, 84, 100, 144-146).

El ácido etidróico, **etidronato** o también denominado 1-hidroxi-etilideno-1,1-bisfosfonato (**HEBP** o HEDP) se considera un ácido débil no tóxico con un pH de la sal comprendido entre 10 y 12. Se usa para la desinfección del agua de las piscinas y se ha incorporado en productos de uso en el hogar y el cuidado personal como en la fabricación de jabones y de forma sistémica. Además, es un fármaco del grupo de los bifosfonatos, que se emplea para el tratamiento de enfermedades sistémicas óseas como las neoplasias óseas, la enfermedad de Paget y la osteoporosis (36, 147).

### **d. Factores que influyen en su acción.**

#### **d.1. Concentración, tiempo de exposición y volumen.**

El volumen de quelante recomendado por conducto es variable (1, 3, 5 o 10 ml) (3, 35, 36, 40, 140, 148-153) y el tiempo de exposición es de entre 1-5 minutos dependiendo del tipo de quelante (36, 140, 150, 154, 155). En general, a mayor concentración y tiempo de exposición, mayor efecto sobre la composición química de la dentina aumentándose la eliminación de fosfatos, la exposición de colágeno y la proporción amida III/fosfato (144) y con todo ello, disminuyendo la resistencia a la fractura de la dentina (40).

### **EDTA:**

Nygaard-Ostby en 1957 (156) introdujo por primera vez el uso de los agentes quelantes en endodoncia sugiriendo el uso de EDTA a una **concentración** de 15% y pH 7,3 (sal disódica del EDTA). Pero el efecto decalcificante del EDTA depende también del **tiempo** de aplicación. Uzunoglu y cols (40) observaron que los dientes tratados con 10 ml de 5% EDTA durante 10 minutos seguido por 10 ml de 1% NaOCl durante 1 minuto presentaban una resistencia a la fractura mayor que los tratados con 17% EDTA durante el mismo tiempo. Para evitar la disminución de la microdureza dentinaria, se recomiendan concentraciones bajas de quelantes o menores tiempos de exposición: 5% EDTA durante 10 minutos o 17% EDTA durante 1 minuto (40).

Saito y cols (148) compararon diferentes **tiempos de aplicación** (1 min, 30 seg y 15 seg) del 17% EDTA (1ml) seguido por 3 ml de NaOCl, encontrando que el tiempo más eficaz para la eliminación del barrillo dentinario era de 1 minuto. También De-Deus y cols (145) observaron la eliminación completa de barrillo dentinario al utilizar 17% EDTA durante 1 minuto produciéndose en tiempos prolongados de 3-10 minutos erosión de los túbulos dentinarios y reducción de la microdureza de la dentina (100, 145, 150, 157). La eficacia del EDTA disminuye a lo largo del tiempo porque desciende su pH y tiene un peor efecto desmineralizante en dentina esclerosada (137, 158).

En cuanto al **volumen**, Crumpton y cols (149) compararon diferentes volúmenes (1, 3 y 10 ml) de 17% EDTA durante 1 minuto seguido por 3 ml de 5,25% NaOCl; concluyendo que 1 ml de EDTA durante 1 minuto era tan efectivo como el resto de volúmenes para eliminar el barrillo dentinario. Por tanto, su efecto quelante es tiempo dependiente pero no está influido por el volumen.

### **HEBP:**

En el caso del HEBP, se emplean dos **concentraciones** diferentes de la sal tetrasódica del ácido etidróico ( $\text{Na}_4\text{HEBP}$ ): 18% y 9%. Tartari y cols (159) mostraron pequeños cambios en la superficie cuando se empleaba una concentración del 9% HEBP durante 5 minutos después del tratamiento con NaOCl, lo que confirma su efecto débil sobre la dentina. Yadav y cols (153) observaron que la concentración del 18% HEBP fue más eficaz que la concentración del 9% HEBP en la eliminación del barrillo dentinario en todos los tercios del conducto radicular excepto en la zona apical. De-Deus y cols (145)

vieron que ambas concentraciones (9% y 18%) necesitaban un **tiempo** de 5 minutos de contacto directo con la superficie dentinaria para la eliminación del barrillo dentinario. Sin embargo, no hay estudios que analicen aún el **volumen** de HEBP necesario.

#### **d.2. Tensión superficial y surfactantes.**

Aunque el EDTA tiene una tensión superficial algo más baja que el NaOCl (46,8 mJ/m<sup>2</sup>) (116, 160) se ha combinado este quelante con diferentes surfactantes catiónicos (como la cetrimida) o aniónicos para disminuirla aún más. Según Zehnder y cols (161) la incorporación de surfactantes a los agentes quelantes puede reducir su tensión superficial a la mitad. Sin embargo, se ha observado que no mejoran su capacidad para eliminar el barrillo dentinario (161-164) debido probablemente a las propiedades hidrofílicas de las paredes dentinarias cuando son preparadas durante la instrumentación. Por tanto, en el caso del EDTA y HEBP, la incorporación de surfactantes no mejora su eficacia en eliminar la materia inorgánica del barrillo dentinario (161-164).

#### **d.3. Activación.**

La eficacia de estas soluciones aplicadas en el interior del conducto disminuye significativamente de coronal a apical (146) aunque su activación incrementa su efectividad en la eliminación del barrillo dentinario (138, 164-166) teniendo en cuenta que se activa una cantidad de volumen de irrigante pequeña.

En cuanto a la activación del **EDTA**, se ha observado que su activación con ultrasonidos durante 1 minuto a 2 mm de la longitud de trabajo seguido de NaOCl mejora la eliminación del barrillo dentinario en la zona apical (138, 164).

En cuanto al **HEBP**, no hay trabajos publicados que evalúen el efecto de la activación del HEBP de forma aislada sobre el barrillo dentinario. En cambio, el efecto de la activación de este quelante combinado con el NaOCl aumenta la desinfección bacteriana de los túbulos dentinarios (167) y la disolución de tejido orgánico (41).

### **3.3. INTERACCIONES entre agentes disolventes de tejido orgánico e inorgánico.**

Como hemos comentado anteriormente, el protocolo clínico convencional de irrigación combina diferentes irrigantes, ya que no se ha encontrado uno que por sí solo sea ideal. Se combina el NaOCl para disolver la materia orgánica y un quelante, en nuestro caso EDTA o HEBP para eliminar el barrillo dentinario. Pero hay que tener en cuenta que en estos casos pueden existir interacciones químicas entre ellos.

Normalmente, los diferentes irrigantes endodónticos entran en contacto unos con otros dentro del sistema de conductos radiculares ya que no se suele lavar cuidadosamente con una sustancia neutra ni aspirar y secar con puntas de papel entre ellos (36, 168). Se ha descrito que la mezcla del NaOCl con otros irrigantes puede dar lugar a una disminución del pH, pérdida de cloro libre, liberación de cloro gas y formación de subproductos (101).

A continuación, se describen las interacciones del EDTA y HEBP cuando son mezclados con el NaOCl ya que estas pueden disminuir o potenciar su efecto, como puede ser el caso de la disolución de tejido orgánico (objeto de nuestro estudio), capacidad antimicrobiana o la capacidad quelante del EDTA o HEBP y producir precipitados tóxicos adhiriéndose a las paredes de dentina dificultando el sellado de la obturación e incluso tiñendo la dentina.

#### **3.3.1. NaOCl-EDTA.**

##### **a. Capacidad de disolución.**

La capacidad de disolución de la combinación del NaOCl con el EDTA va a estar relacionada con el contenido de cloro libre (67). Aunque también se cree que pudiera ser debido a la reducción de los niveles de hidróxido de sodio (NaOH) que contribuyen, aunque de forma menor que el cloro libre, a la disolución de tejido porque se produce una transferencia de iones de Na<sup>+</sup> al EDTA (67).

Se ha observado que cuando se mezcla el EDTA con el NaOCl se inactiva la capacidad de este último para disolver materia orgánica porque se produce una pérdida inmediata del cloro libre (36-39, 67, 145, 169, 170). Las formas disódica (Na<sub>2</sub>EDTA) y trisódica (Na<sub>3</sub>EDTA) del EDTA interaccionan de forma rápida con el NaOCl cuando son mezclados y dan lugar a una reacción exotérmica debido a una neutralización ácido-base en la que el NaOCl reacciona con los grupos amino del EDTA produciendo cloraminas, reduciendo el cloro libre y el pH y formando gas cloro (Cl<sub>2</sub>) (36, 37, 144, 169, 171).

Baumgartner e Ibay (171) en 1987 determinaron la cantidad de gas cloro evaporado que se producía al combinar 5,25% NaOCl con otras soluciones irrigadoras (3% peróxido de hidrógeno, 50% ácido cítrico y 15% EDTA). La cantidad de solución de cada irrigante que era añadida en el contenedor era de 15 ml en intervalos de 15 min durante 2 horas hasta alcanzar un volumen de 240 ml. La evaporación de cloro gas conllevaba a una reducción del cloro libre. En la combinación de la mezcla del NaOCl con el ácido cítrico se producía significativamente más cloro gas (3,5 ppm) que con la mezcla del NaOCl con el EDTA (menor de 0,5 ppm). En cambio, no era detectado en la combinación NaOCl con peróxido de hidrógeno y en el NaOCl aislado empleado como control.

Por tanto, el EDTA tiene un efecto sustancial sobre el NaOCl al disminuir su capacidad de disolver el tejido, pues disminuye entre un 80 y un 88% la cantidad de cloro libre disponible (37, 38), habiendo llegado a describirse una disminución de incluso el 95% en un minuto (172). También, Tartari y cols en 2015 (39) observaron esta inactivación del NaOCl al mezclarlo con EDTA (5% NaOCl+17% EDTA) e intentar disolver tejido muscular bovino sumergiéndolo en 15 ml de esta mezcla, produciéndose incluso una ganancia de peso del tejido del 1%. También Irala y cols en 2010 (67) evaluaron la capacidad de disolución del tejido pulpar bovino (5 mm) sumergiéndolo en diferentes soluciones mezcladas con diferentes concentraciones de NaOCl (1% y 2,5%) y 17% EDTA a diferentes proporciones sin renovarlas durante 48 horas observando que el pH de la mezcla (en una relación 1:1) disminuyó de 10 a 8, después de 48 horas. Esto es más evidente aún en la mezcla del NaOCl con el ácido cítrico, en la que la reducción de cloro libre es completa al minuto de la mezcla (36).

Cuando se combina el  $\text{NaOCl}$  con el EDTA en las mismas proporciones de volumen, a mayor concentración del  $\text{NaOCl}$  se produce una disolución menor (73) y el pH de la solución resultante disminuye con el tiempo; pero el pH no cambia cuando el volumen del EDTA es mayor que el del  $\text{NaOCl}$  (67). Asimismo, la formación de burbujas por la liberación de gas cloro no se produce cuando la concentración de  $\text{NaOCl}$  es muy pequeña (0,16%  $\text{NaOCl}$ ) pero sí, a partir de una concentración del 1%  $\text{NaOCl}$  (168).

Tartari y cols en 2017 (84) evaluaron las posibles interacciones de diferentes tipos de sal del EDTA (trisódica y tetrasódica) con  $\text{NaOCl}$ , concluyendo que la interacción depende del pH de la solución y del tipo de sal de EDTA empleada. La sal tetrasódica necesita más tiempo para eliminar el barrillo dentinario (5 minutos), pero al mezclarla con  $\text{NaOCl}$ , la reducción del cloro libre es más lenta y con ello, el  $\text{NaOCl}$  puede disolver tejido; siendo la sal trisódica la que inactiva de forma inmediata al  $\text{NaOCl}$  cuando son mezclados. En todos los casos, después de un día se produce ausencia total de cloro libre.

El pH de las mezclas del  $\text{NaOCl}$  con el  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  a diferentes concentraciones va descendiendo a lo largo del tiempo siendo más estable con la sal trisódica (84). Esto es importante puesto que parece ser que la interacción química entre el EDTA y  $\text{NaOCl}$  depende del pH de la solución y de la cantidad de iones de sodio que tenga el EDTA.

### **b. Capacidad antimicrobiana.**

Hay que tener en cuenta si las dos soluciones al mezclarse mantienen la efectividad antimicrobiana que poseen, en diferentes grados, de forma individual.

En cuanto al 2,5%  $\text{NaOCl}$ , este mantiene su efectividad antimicrobiana al mezclarlo con la sal tetrasódica del EDTA a diferentes concentraciones (10% y 20%) con o sin surfactante (en este caso, cetrimida) contra biofilms de *Enterococcus faecalis* en bloques de dentina cuando estos se sumergieron en 100  $\mu\text{l}$  de la solución mezclada durante 3 min, debido a que la reducción del cloro libre del  $\text{NaOCl}$  causada por el  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  es muy pequeña, mostrando resultados similares a los obtenidos por el  $\text{NaOCl}$  solo (173).

En cuanto al 17% EDTA, este también mantiene su efectividad antimicrobiana cuando es mezclado con el 1%  $\text{NaOCl}$  (37). En cambio, el  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  de forma aislado mostró una eficacia antimicrobiana más baja que el 2,5%  $\text{NaOCl}$  o la mezcla de este con el  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  (173).

### **c. Capacidad quelante del EDTA.**

El  $\text{NaOCl}$  no afecta a la acción quelante del EDTA (36, 37, 172, 174-176).

Grawehr y cols en 2003 (37) observaron que al mezclar el 17% EDTA con 1%  $\text{NaOCl}$ , la presencia de este tenía poco efecto en la capacidad de quelación del EDTA coincidiendo con los resultados obtenidos por Saquy y cols en 1994 (174).

También Grande y cols en 2006 (175) estudiaron mediante resonancia magnética nuclear si las propiedades oxidantes del  $\text{NaOCl}$  inactivaban al EDTA. Estudiando las interacciones químicas de estas dos sustancias a lo largo del tiempo (1,5 min, 4,5 min, 7 min, 16 min, 25 min, 50 min, 80 min, 120 min) concluyeron que la reacción entre  $\text{NaOCl}$  y EDTA causaba la oxidación de este último, que conducía a su desactivación progresiva, pero de forma extremadamente lenta siendo incompleta incluso después de 120 min. Así demostraron, teniendo en cuenta las limitaciones de un estudio *in vitro*, que la irrigación final con  $\text{NaOCl}$  después de emplear el EDTA para la eliminación del barrillo dentinario no limitaba los efectos de quelación de este en un periodo de tiempo clínico. La degradación del EDTA se debía a una reacción de oxidación que da lugar a unos subproductos como son el ácido glicoxílico y el ácido etilendiaminotriacético, ambos biocompatibles con los tejidos.

Recientemente, Biel y cols en 2017 (172) midieron la pérdida de la capacidad quelante de calcio al mezclar 18%  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  con 5%  $\text{NaOCl}$  siendo del 13% al principio y del 34% después de 60 min comparándolo con una solución del EDTA mezclado con agua.

Por tanto, el  $\text{NaOCl}$  tiene poco efecto negativo sobre el EDTA manteniendo este su capacidad quelante. Aunque existe una degradación del EDTA por oxidación lenta pero progresiva a lo largo del tiempo (36, 37, 175, 176).

#### **d. Formación de subproductos y precipitados.**

Una de las interacciones negativas de la combinación de distintos irrigantes es la posibilidad de la producción de subproductos y precipitados que pueden interferir posteriormente con el sellado de la obturación de conductos o teñir la dentina.

Grande y cols en 2015 (175) detectaron mediante resonancia magnética nuclear que a partir de los 7 min de la mezcla del NaOCl al 1% con 17% EDTA se forman subproductos.

Prado y cols en 2013 (168) no observaron la presencia de precipitado al mezclar 0,5 ml de diferentes concentraciones de NaOCl con 17% de EDTA en proporción 1:1. Recientemente, Krishnan y cols en 2017 (170) analizaron el cloro libre de 5,2% NaOCl cuando se mezcló con diferentes irrigantes: 0,1% octenidina (OCT es un surfactante catiónico derivado de la piridina, que tiene capacidad antimicrobiana), SmearOff® (18% EDTA + 1% CHX), 17% EDTA y CHX a diferentes concentraciones (0,2%, 2% y 5%) y diferentes proporciones (90:10, 80:20, 50:50) mediante valoración yodométrica y observaron que pequeñas cantidades de SmearOff® y EDTA reducían significativamente el cloro libre del NaOCl con tal rapidez que no dio tiempo a formarse ningún precipitado.

### **3.3.2. NaOCl-HEBP.**

#### **a. Capacidad de disolución del NaOCl.**

A diferencia del EDTA, el HEBP parece no alterar la capacidad de disolución de tejido orgánico del NaOCl al mezclarse con él (39, 144) con lo que podría usarse su combinación (NaOCl+HEBP) como irrigante único durante y después de la instrumentación, previniendo así la acumulación de barrillo dentinario y disolviendo el tejido orgánico e inorgánico al mismo tiempo durante la instrumentación, y en consecuencia, reduciendo el tiempo de trabajo puesto que podría eliminarse la fase de irrigación final o postconformación de los conductos radiculares (15, 36, 39, 144, 177).

Al combinarse  $\text{NaOCl}$  y HEBP, se reducen el pH y el cloro libre del  $\text{NaOCl}$  de forma lenta y progresiva a lo largo del tiempo después de una hora, dependiendo de las proporciones, concentraciones y temperatura de la mezcla del  $\text{NaOCl}$  y HEBP (36, 172, 177, 178). Por ejemplo, se ha observado que la mezcla de 1%  $\text{NaOCl}$  con el 7% HEBP en una proporción 1:1 fue estable durante una hora; en 5:1 durante un día y solamente en una proporción 1:5 se perdió el 50% del contenido de cloro libre tras 1 hora de la mezcla (36).

Zollinger y cols en 2017 (178) estudiaron la interacción química entre el  $\text{NaOCl}$  y el Dual Rinse® (HEDP; Medcem, Weinfelden, Switzerland), que es HEBP comercializado para uso endodóntico. Entre estas sustancias se produjo una reacción de oxidación-reducción con pérdida de cloro libre, que dependía de la concentración del  $\text{NaOCl}$  y de la temperatura de la combinación. A temperatura ambiente, cuando se empleó una concentración de 5%  $\text{NaOCl}$  la pérdida de cloro libre fue del 20% después de una hora, mientras que si las concentraciones eran menores (2,5% y 1%  $\text{NaOCl}$ ) esa misma pérdida de cloro libre se producía más tarde, manteniéndose relativamente estable a las 2 y 4 horas, respectivamente. En comparación, las soluciones de  $\text{NaOCl}$  aisladas (5%, 2,5% y 1%) se mantuvieron estables durante 8 horas. Biel y cols en el mismo año (172) encontraron un 86% de cloro libre después de 1 hora y a temperatura ambiente cuando se mezcló con una concentración de  $\text{NaOCl}$  del 5,5%.

El aumento de la temperatura de la mezcla a 60°C causó una pérdida completa del cloro libre a la hora. En cambio, si la mezcla se conservaba a una temperatura de 5°C, se mantenía estable durante 7 días, aunque el  $\text{NaOCl}$  era menos efectivo. Con el calor, el HEBP se descompone en ácido acético y fosfónico (178).

### **b. Capacidad antimicrobiana del $\text{NaOCl}$ .**

Se ha observado que el HEBP no interfiere en la capacidad antimicrobiana que tiene el 2,5%  $\text{NaOCl}$  sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* ni en la desinfección de los túbulos dentinarios, puesto que su incorporación no causó una pérdida de cloro libre importante en los primeros 60 minutos, manteniéndose estable después de 10 minutos, disminuyendo al 2,41% después de 1 hora y al 1,77%, después de 2 horas, obteniéndose resultados similares de pH (179, 180). En cambio, la presencia de polvo de dentina (100

mg de polvo suspendido en 100  $\mu\text{l}$ ) disminuye significativamente la actividad antimicrobiana contra biofilms de *Enterococcus faecalis* de la mezcla del 1%  $\text{NaOCl}$  con HEBP. Asimismo, si la mezcla se realiza con 2,5%  $\text{NaOCl}$  no se afecta a los 3 minutos de haberse sumergido las muestras (181).

Durante la investigación reflejada en esta tesis doctoral no se ha encontrado ningún estudio que analice la alteración en la capacidad quelante del HEBP ni la formación de precipitado que se producen durante la interacción de HEBP y  $\text{NaOCl}$ .

### **3.4. PROTOCOLOS de irrigación: $\text{NaOCl-EDTA}$ versus $\text{NaOCl-HEBP}$ .**

A la vista de lo anterior, para cumplir todos los objetivos de la irrigación en un tratamiento de conductos convencional es necesaria la combinación de diferentes irrigantes ya que no se ha encontrado uno que por sí solo sea ideal. También existe suficiente evidencia científica para que el irrigante de elección encargado de disolver la materia orgánica sea el  $\text{NaOCl}$  puesto que los agentes quelantes no tienen esa capacidad. Sin embargo, como hemos observado a lo largo de la introducción, no existe un quelante perfecto para la eliminación del barrillo dentinario (3, 39).

Si analizamos los estudios que comparan el EDTA y el HEBP para decidir cual sería el más conveniente encontramos ventajas e inconvenientes de ambos. Así, los estudios que comparan ambas combinaciones de irrigantes encuentran las siguientes diferencias entre el uso combinado de  $\text{NaOCl}$  con EDTA o con HEBP:

#### **3.4.1. En cuanto a la alteración de la capacidad de disolución del $\text{NaOCl}$ .**

Tartari y cols (39) estudiaron la influencia del EDTA y HEBP sobre la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$  cuando eran mezclados en las mismas proporciones, viendo que los agentes quelantes influyeron en la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$ ; el EDTA lo inactivó sin producir pérdida de peso del tejido muscular bovino cuando fue sumergido en la mezcla y el HEBP disminuyó ligeramente esta capacidad sin mostrar diferencias significativas a los 5 minutos, pero sí a los 10 y 15 minutos.

Girard y cols (177) analizaron las interacciones que podían existir al mezclar 1% NaOCl con un gel acuoso de HEBP (2% alginato, 3% aerosil, 10% Tween 80 y 18% HEBP) comparándolo con la mezcla con dos pastas quelantes de EDTA (RC Prep® y Glyde®). Para analizar el cloro libre realizaron una valoración yodométrica a los 5 min y a la hora y una espectroscopia puesto que cuando hay dos agentes oxidantes, la primera prueba no es capaz de discernirlos. El gel con HEBP mostraba poca interferencia sobre el cloro libre y solo ocasionó un ligero descenso del cloro libre después de 1 hora, detectándose el 90 % del cloro libre inicial; mientras que la pastas de EDTA eliminaron completamente el cloro libre a los 5 minutos.

Biel y cols (172) estudiaron la disolución máxima de los dos quelantes EDTA y HEBP en agua a temperatura ambiente y su efecto sobre el cloro libre inicial del NaOCl (1% y 5%) durante 1, 10, 20, 30 y 60 min, empleando la valoración iodométrica y el efecto del NaOCl sobre la capacidad descalcificante de los dos quelantes. Los dos quelantes se disolvieron en NaOCl en un minuto. La disolución máxima del HEBP en agua fue de un 44,6% y de un 38,2% para el EDTA. El 18% Na<sub>4</sub>HEBP al mezclarse con 5% NaOCl en proporción 1:1 causó una reducción del 16% del cloro libre inicial en 1 hora. 9% Na<sub>4</sub>HEBP causó una reducción ligeramente menor, del 14%. Cuando se mezclaron las dos concentraciones de HEBP con 1% NaOCl, las diferencias en el cloro fueron mayores (28% y 13%, respectivamente). En cambio, la reducción provocada por 18% Na<sub>4</sub>EDTA fue inmediata, del 95% en un minuto al mezclarse con 5% NaOCl (disminuye el pH y se produce un aumento de temperatura) y del 27% al mezclarse con 1% NaOCl (sin disminución pH ni cambio de temperatura). Concentraciones más bajas de EDTA (3%) y NaOCl (1%) hacen que la mezcla sea más estable, manteniéndose el 87% de cloro libre inicial en 30 minutos, mostrando cierta compatibilidad con NaOCl a bajas concentraciones y durante un periodo de tiempo corto. Sin embargo, al disminuir la concentración de NaOCl se necesitaría más tiempo para disolver el tejido. 5% NaOCl redujo la capacidad descalcificante del HEBP en un 24% después de 1 hora y la del EDTA, en un 34% manteniendo aún así su capacidad quelante.

Está aceptado que los agentes quelantes fuertes, como la sal disódica y trisódica del EDTA (Na<sub>2</sub>EDTA o Na<sub>3</sub>EDTA), se empleen para eliminar el barrillo dentinario al final de la instrumentación del sistema de conductos radiculares en un protocolo de irrigación final, para no interferir durante la instrumentación con la capacidad de

disolución que tiene el NaOCl porque al mezclarse se reduce drásticamente el cloro libre (36, 37, 39, 84, 144, 145, 171). O bien utilizar una solución pre-mezclada de NaOCl con HEBP cuya reducción del cloro libre oscila entre el 10-28% en la primera hora (172, 177).

### **3.4.2. Efecto antimicrobiano.**

En cuanto al efecto antimicrobiano de los protocolos de irrigación final se ha observado que el NaOCl después del EDTA (3% NaOCl-17% EDTA-3% NaOCl) o mezclado con el HEBP (6% NaOCl + 18% HEBP) obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la eliminación de biofilms de *E. faecalis* consiguiendo a 200 µm una reducción completa de bacterias (182). Esto conlleva a que la quelación final o continua durante la instrumentación permite una mejor penetración del NaOCl en los túbulos dentinarios favoreciendo la reducción de la carga microbiana (36).

### **3.4.3. Uso de quelantes durante la instrumentación.**

Cada vez está más claro que el uso de quelantes durante la instrumentación no incrementa el transporte del conducto; es decir, la desviación no deseada de la forma original del conducto (183-185) siendo aceptada una desviación de hasta 0,10 mm (186) y existiendo una mayor tendencia de esta hacia la cara externa de la curvatura (184, 187).

Aunque Bramante y cols en 2000 (188) aconsejaron posponer el uso del EDTA en solución al final de la instrumentación porque se producían desviaciones apicales, hay que tener en cuenta que en su estudio se valoró el transporte apical del conducto con la superposición de imágenes radiográficas y se emplearon limas manuales de NiTi. Además, no se especificó ni la concentración, ni el volumen ni el tiempo de actuación del agente quelante. En los estudios más actuales (183, 185) se observa que el EDTA no incrementa de forma significativa el transporte apical cuando se emplea de forma aislada con limas rotatorias de Ni-Ti y se valora este parámetro con metodologías más válidas como el µCT o CBCT. En ellos, ni siquiera se observan cambios en la longitud de trabajo (183).

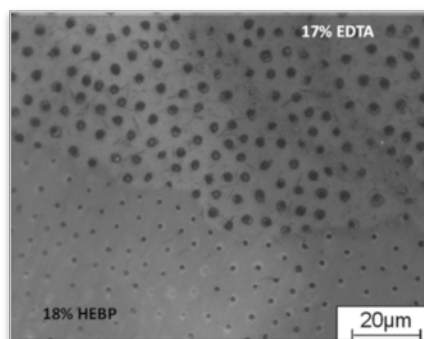
Tampoco se observaron diferencias significativas durante la instrumentación rotatoria cuando se asoció NaOCl con quelantes, ya fuera de forma alternante con EDTA

o mezclado con HEBP, aunque este último mostró un mayor transporte apical en la superposición de radiografías digitales previas y postoperatorias (184). Esta diferencia pudo deberse a que el tiempo de contacto del HEBP es mayor que del EDTA, aunque sea un quelante débil y/o a la desproteinización del NaOCl aunque esté mezclado con el quelante. Pero no se ha estudiado que es lo que ocurriría si el HEBP se emplease como el EDTA de forma alternante con el NaOCl.

#### 3.4.4. Capacidad quelante.

Como se ha mencionado anteriormente en esta tesis doctoral, el EDTA es un quelante fuerte y el HEBP es un quelante débil. En consecuencia, se ha observado que la capacidad quelante del HEBP es tres veces menor que la del EDTA (36); necesitando el HEBP más tiempo (5min) para eliminar el barrillo dentinario (145).

El estudio de De-Deus y cols (145), que sugiere que el tiempo de acción sea de 5 minutos, aplica los quelantes (HEBP y EDTA) en la superficie horizontal de dentina (discos de dentina), con lo que difiere de la situación clínica puesto que la disposición de los túbulos dentinarios es diferente a la que presenta la dentina longitudinalmente en el conducto radicular (**Figura 15**). Igualmente, otros autores (152, 153) obtuvieron peores resultados en la eliminación del barrillo dentinario con HEBP que con 17% EDTA. Únicamente un estudio, el de Ulusoy y cols (41), observó una mayor eficacia del HEBP a ambas concentraciones (18% y 9%) que el EDTA en la eliminación del barrillo dentinario presente en el tercio apical de conductos radiculares, pero no encontraron diferencias significativas ni en tercio coronal ni medio coincidiendo con el estudio de Kuravilla y cols (2015) al comparar el 17% EDTA con el 18% HEBP.



**Fig.15.** Eliminación de barrillo dentinario aplicando EDTA y HEBP a la superficie horizontal de un disco de dentina. Imagen tomada de De-Deus y cols, 2008 (145).

La acción quelante del HEBP depende de su concentración observándose que el 20% HEBP elimina la misma cantidad de iones calcio que el 17% EDTA (36, 153, 189).

Lottanti y cols (100) observaron que la combinación mezclada de 2% NaOCl con 18% HEBP empleada durante y después de la instrumentación tenía similares resultados en cuanto a la eliminación del barrillo dentinario en el tercio medio y apical que cuando se irrigaba con NaOCl durante la instrumentación y después, se irrigaba con EDTA durante 3 min pero a diferencia de este, no causaba descalcificación de las paredes dentinarias. En cuanto a su acción quelante eliminó mayor cantidad de barrillo dentinario en la zona apical independientemente de su concentración con respecto al 17% EDTA, aunque no presentó diferencias significativas en los tercios cervical y medio del conducto radicular.

#### **3.4.5. Microdureza de la dentina.**

La microdureza intrínseca de la dentina viene determinada por el grado de mineralización de la dentina y de la cantidad de hidroxapatita en la zona intertubular (163). Los quelantes reducen la microdureza dentinaria porque alteran el contenido mineral de la dentina (140).

El EDTA disminuye la microdureza dentinaria (140, 155, 190-193) hasta una profundidad de 500  $\mu\text{m}$  (157), dependiendo de su concentración y del tiempo de exposición, con lo que se podría paliar este efecto empleando concentraciones más bajas y tiempos más cortos (150, 192, 194, 195). En cambio, se ha observado que el empleo del HEBP puede reducir la acumulación de restos dentinarios sin disminuir tanto la microdureza de la dentina como el EDTA (196). El 18% HEBP afecta al contenido mineral de forma similar que el 17% EDTA en cuanto al calcio, fósforo, potasio, magnesio, sodio, manganeso y zinc se refiere, existiendo sólo diferencias significativas entre ellos en el contenido de sulfuro (140, 161). Igualmente, la incorporación de surfactantes tanto en el EDTA como en el HEBP no alteraron de forma significativa la microdureza dentinaria (161, 163).

### **3.4.6. Influencia en la obturación posterior del sistema de conductos radiculares.**

La utilización de los diferentes agentes quelantes puede también tener efecto en la obturación posterior del sistema de conductos en cuanto a la fuerza de adhesión y adaptación marginal de los materiales empleados se refiere.

#### **a. En cuanto a la fuerza de adhesión:**

No se observaron diferencias significativas en la fuerza de adhesión de la obturación realizada con gutapercha y cemento sellador AHPlus mediante técnica de condensación lateral tras la irrigación mediante NaOCl a una concentración de 5,25% combinado con el 17% EDTA o el 18% HEBP sin mezclar (197). En cambio, cuando se realizó una irrigación inicial con una concentración menor del 1,3% NaOCl durante 20 minutos seguida de irrigación final con 17% EDTA durante 1 minuto o 18% HEBP o MTAD durante 5 minutos, el EDTA permitió una mayor fuerza de unión del cemento de resina epóxica AHPlus® con la dentina, seguido del HEBP (198).

Sin embargo, la quelación continua con la mezcla del 5% NaOCl y 18% HEBP durante la instrumentación seguido de una irrigación final con 17% EDTA mostró una mayor fuerza de adhesión del cemento AHPlus® que cuando se utilizó un protocolo de irrigación convencional (2,5% NaOCl durante la instrumentación y 17% EDTA en la irrigación final) o cuando se utilizó únicamente 2,5% NaOCl (167). De hecho, este último grupo mostró los peores resultados debido probablemente a la presencia de barrillo dentinario y la falta de exposición del colágeno. Además, se observó cómo la fuerza de adhesión del cemento iba disminuyendo corono-apicalmente debido a la presencia de túbulos más esclerosados en el tercio apical (167). Contrariamente a los estudios anteriores, Tuncel y cols (199) observaron que la irrigación final con cualquiera de los dos quelantes (EDTA y HEBP) no mejoraba significativamente la fuerza de unión ni del AHPlus® ni de cementos de silicato de calcio como iRootSP® con la dentina radicular.

#### **b. En cuanto a la adaptación marginal:**

Ulusoy y cols (41) evaluaron la adaptación marginal de la gutapercha y cemento AHPlus® aplicando la técnica de condensación de onda continua sobre las paredes dentinarias previamente tratadas con diferentes quelantes (EDTA, HEBP y ácido

peracético) durante la fase de irrigación final con un volumen de 2,5 ml, dispensados con aguja 30 G, durante 1 minuto. El grupo tratado con 18% HEBP fue el que mostró una mejor adaptación marginal de la obturación. También se observó mejor calidad de adhesión del material de obturación resilon/epiphany® cuando se utilizó HEBP que cuando se empleó EDTA, MTAD y NaOCl (200).

## **4. JUSTIFICACIÓN**



A la vista de la evidencia científica planteada en esta introducción parece lógico plantear dos alternativas diferentes como posibles protocolos de irrigación:

1.- Irrigar con NaOCl durante toda la instrumentación para disolver el tejido pulpar y reducir la carga microbiana, asumiendo la acumulación de restos dentinarios en las paredes dentinarias y en zonas inaccesibles para ser estos eliminados con el protocolo de irrigación final con un quelante fuerte como la sal disódica o trisódica del EDTA seguido del NaOCl para eliminar el colágeno expuesto por la acción del EDTA y favorecer así la penetración del NaOCl en los túbulos dentinarios ya que este no inactiva las propiedades quelantes del EDTA aunque existe una degradación pero no es inmediata.

2.- Tanto el HEBP como la sal tetrasódica del EDTA podrían mezclarse durante la instrumentación con el NaOCl para combinar la eliminación del barrillo dentinario que se produce y la disolución del tejido pulpar y reducción microbiana aunque necesiten de más tiempo para eliminar el barrillo dentinario al tratarse de quelantes débiles y disminuyesen ligeramente la capacidad de disolución del tejido pero podría compensarse con una continua renovación de las soluciones con una irrigación de flujo continuo controlado, sin que hiciese falta un protocolo de irrigación final especial.

Sin embargo, podría existir la opción de emplear la sal trisódica o disódica del EDTA sin mezclarse con el NaOCl irrigando durante la instrumentación de forma alternante, que es como se utilizan los irrigantes en la clínica.

De hecho, Pérez-Heredia y cols (4) estudiaron la forma alternante de dispensar el NaOCl con varios quelantes, entre los que se encontraba el 15% EDTA, para ver su efectividad en la eliminación del barrillo dentinario generado durante la instrumentación manual y rotatoria, sin realizar protocolo de irrigación final. Se aplicó primero, 5 ml de 2,5% NaOCl seguido de la lima y después, 5 ml de quelante y así sucesivamente repitiéndose la misma secuencia hasta el final de la instrumentación tanto manual como rotatoria con Protaper® Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland). Se observó que el uso del NaOCl con diferentes quelantes era efectivo en la eliminación del barrillo dentinario sin mostrar diferencias en cuanto a las técnicas de instrumentación y sin accidentes de transporte apical en la preparación.

Es decir, la forma alternante de dispensar el NaOCl con un agente quelante ha sido estudiada para ver su efectividad en cuanto a la eliminación del barrillo dentinario durante la instrumentación (4, 184) pero no existen estudios en los que se haya investigado el efecto alternante del NaOCl y un quelante (ni EDTA, ni HEBP) sobre la capacidad de disolución del NaOCl en tejido pulpar controlando el flujo de la irrigación, sólo existen sumergiendo otro tipo de tejido (muscular bovino) en las soluciones mezcladas (39). Es posible que tanto la renovación de los irrigantes, como su flujo continuo y alternante pudieran afectar a los resultados obtenidos en los estudios previos, en los que se analiza la capacidad de disolución de los dos irrigantes imprescindibles durante el tratamiento de conductos, NaOCl y quelante, sumergiendo el tejido en soluciones premezcladas. Además, el empleo de un flujo continuo de irrigante que permite el recambio de soluciones como proponemos en este estudio y la dispensación de los distintos irrigantes de forma independiente y alternante simula una situación más próxima a la clínica y con ello, se daría una respuesta a las necesidades actuales de búsqueda de una combinación de irrigantes que posean a la vez la capacidad de disolver la materia orgánica e inorgánica mientras se están instrumentando los conductos, para obtener una mejor limpieza y desinfección y una menor acumulación de restos dentinarios con la menor afectación posible de la dentina radicular en cuanto a dureza y rugosidad.

## **5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **HIPÓTESIS**

La hipótesis nula ( $H_0$ ) de este estudio *in vitro* es que el 17%  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  y  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  a diferentes concentraciones (18% y 9%) empleados de forma alternante mediante flujo controlado no interfieren en la capacidad de disolución de tejido pulpar bovino del 3%  $\text{NaOCl}$ .

### **5.1. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar los efectos de la combinación del 3%  $\text{NaOCl}$  con diferentes irrigantes quelantes 17%  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  y  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  a dos concentraciones diferentes (18% y 9%), cuando se emplean en un protocolo de irrigación con un flujo continuo y controlado de 1ml/min sobre la disolución del tejido pulpar bovino.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

5.2.1. Comparar la capacidad de disolución de  $\text{NaOCl}$  cuando se utiliza aislado y en combinación con sustancias quelantes: 17%  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  o  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  (18% y 9%), administradas de forma alternante con flujo controlado.

5.2.2. Analizar los cambios del contenido de cloro libre en las diferentes soluciones de  $\text{NaOCl}$  que se producen durante la disolución del tejido pulpar bovino.

5.2.3. Cuantificar los cambios de pH en las diferentes soluciones que se producen durante la disolución del tejido pulpar bovino con respecto a las soluciones iniciales.

5.2.4. Confirmar si se produce un precipitado y/o una reacción exotérmica al mezclar el  $\text{NaOCl}$  con el agente quelante ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  o  $\text{Na}_4\text{HEBP}$ ).



## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**



Se trata de un estudio experimental *in vitro* en el que se busca demostrar una hipótesis causal entre las soluciones y su capacidad de disolución cuando se emplean de forma combinada alternante sobre tejido pulpar bovino en un intervalo breve de tiempo a los 2, 5 y 10 minutos.

### 6.1. PREPARACIÓN DEL TEJIDO PULPAR BOVINO.

Se seleccionaron 10 bovinos cuya edad estuviese comprendida entre 30 y 70 meses por presentar los dientes con ápice completamente formado y poseer un conducto radicular amplio con una pulpa de dimensiones adecuadas. Se observó que teniendo el animal una edad mayor, la pulpa se reducía considerablemente y se descartaron los dientes más distales por el mismo motivo (**Figura 16**).



**Fig.16.** Quijada bovina con sus dientes anteroinferiores.

Se obtuvieron las mandíbulas en el matadero de Leganés (Madrid), bajo supervisión de la veterinaria, después de su sacrificio. Se realizaron las extracciones de los dientes incisivos inferiores (ya que no presentan incisivos superiores) con forceps dentro de las primeras 48 horas tras su sacrificio para uso cárnico y se conservaron en 0,1% de timol. Como este estudio no afectó a la mortalidad ni al proceso de sacrificio del ganado bovino no se consideró un estudio animal que tuviese que pasar ningún comité ético.

Una vez extraídos, la corona y el ápice de los dientes fueron seccionados con un microtomo con una hoja de corte de 0,2mm (0,2mm/D64, Leica Microsystem, Barcelona, España) y se extirpó cuidadosamente el tejido pulpar entero con ayuda de una sonda periodontal y unas pinzas sin dientes para no lacerar el tejido. Las muestras de pulpa entera se lavaron con agua destilada durante 30 segundos para eliminar los restos de sangre. Se conservaron individualmente en microtubos *ependorf* individuales de centrifugación de 1,5ml (Deltalab, SL, Barcelona, España) debidamente identificados que contenían 1 ml de agua destilada (100% humedad) y se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso **(Figura 17)**.



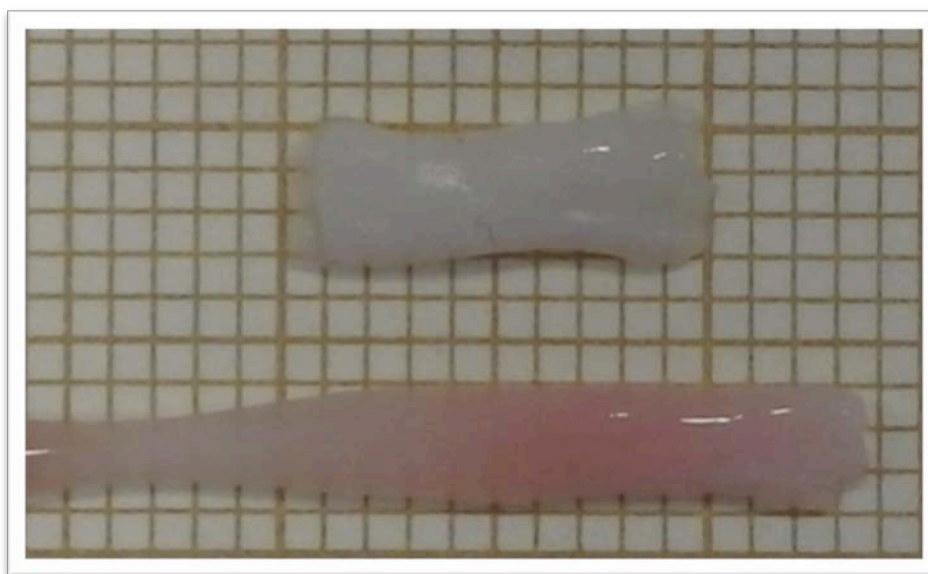
**Fig.17.** Obtención del tejido pulpar bovino.

Antes de realizar el experimento, se mantuvieron los microtubos con el tejido a temperatura ambiente durante 30 minutos para su descongelación y posteriormente, se colocaron en un baño de agua caliente a  $37^\circ\text{C}$  (Precistern Selecta, Barcelona, España) durante 15 minutos para simular las condiciones clínicas.

Las muestras de tejido pulpar se estandarizaron en tamaño (1x3x10 mm). Para ello, se eliminaron las partes más coronal y más apical usando una probeta realizada con portas y papel milimetrado para controlar las dimensiones de grosor, anchura y longitud y ayudados con un bisturí nº15 (Braun, Tuttlingen, Alemania). Todo el proceso de estandarización se realizó bajo magnificación (Lupas de aumento 3.8, ExamVision Akura

Medical, NovaMed Concepts S.L., Madrid, España). Las dimensiones fueron comprobadas con un calibre Mitutoyo digital.

A continuación, se secaron las muestras con papel absorbente durante 30 segundos y con la misma presión para eliminar el exceso de solución en su superficie y se pesaron tres veces en una balanza de precisión hermética y electrónica (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) para estandarizar también su peso inicial, en mg (**Figura 18**).



**Fig.18.** Estandarización del tejido pulpar bovino en dimensiones.

## 6.2. GRUPOS Y SOLUCIONES.

Las muestras de la misma mandíbula bovina se numeraron y distribuyeron aleatoriamente y se asignaron a cada uno de los dos grupos controles ( $n=3$  cada uno) y a cada uno de los cuatro grupos experimentales ( $n=10$  cada uno). Con ello se consiguió que en todos los grupos experimentales hubiera una muestra de cada uno de los animales con el fin de disminuir factores confundidores derivados de la diferencia individual del tejido. Con el mismo objetivo, en los grupos controles se utilizaron 3 muestras de 3 animales diferentes seleccionadas al azar de entre los 10 asignados a cada grupo control.

Las soluciones utilizadas en este estudio fueron 6% NaOCl (CanalPro™ 6% NaOCl, Coltène/Whaledent, GmbH & Co KG, Langenau, Alemania) para el grupo control positivo (PC) y agua destilada para el grupo control negativo (NC). Como soluciones de los grupos experimentales se emplearon: 3% NaOCl (CanalPro™ 3% NaOCl, Coltène/Whaledent, GmbH & Co KG, Langenau, Alemania), 17% Na<sub>2</sub>EDTA (CanalPro™ EDTA 17%, Coltène/Whaledent, GmbH & Co KG, Langenau, Alemania) y 9% y 18% Na<sub>4</sub>HEBP (Cublen K8514GR; Zschimmer&Schwarz, Mohsdorf, Alemania).

Se obtuvieron así 4 grupos (n=10 cada uno). Las soluciones empleadas en cada grupo experimental y su forma de dispensación fueron las siguientes: **(Figura 19)**

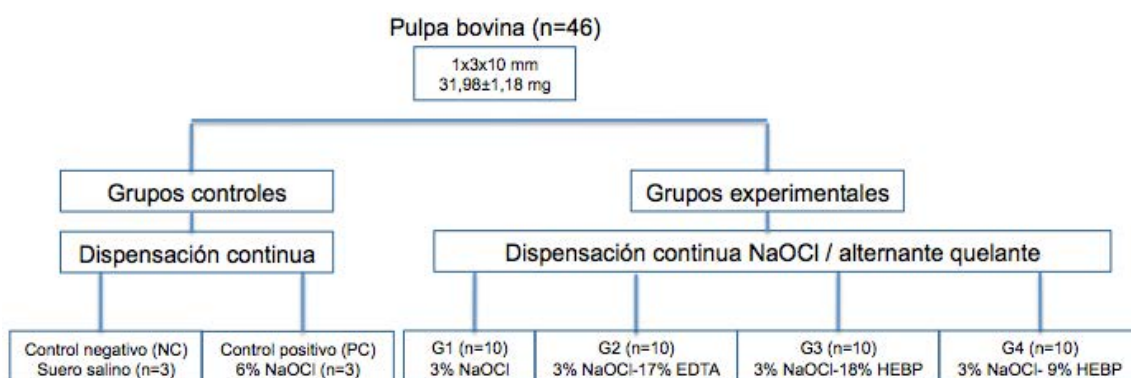
G1- Dispensación continua del 3% NaOCl.

G2- Dispensación continua del 3% NaOCl y alternante del 17% Na<sub>2</sub>EDTA.

G3- Dispensación continua del 3% NaOCl y alternante del 18% Na<sub>4</sub>HEBP.

G4- Dispensación continua del 3% NaOCl y alternante del 9% Na<sub>4</sub>HEBP.

Todas las soluciones de NaOCl y EDTA venían preparadas del fabricante y fueron conservadas en botellas de plástico opacas y cerradas para protegerlas de la luz y a temperatura ambiente siguiendo las instrucciones del fabricante (entre 18-30°C) ya que la luz y la temperatura influyen en su degradación. Las soluciones de Na<sub>4</sub>HEBP fueron preparadas inmediatamente antes de realizar el experimento. Para ello, se disolvieron los gránulos de la sal de HEBP en agua destilada, teniendo en cuenta el porcentaje de la sal activa (85%) (peso/volumen) para obtener las soluciones del 9% y 18% Na<sub>4</sub>HEBP.



**Fig.19.** Distribución de las muestras de tejido pulpar por grupos.

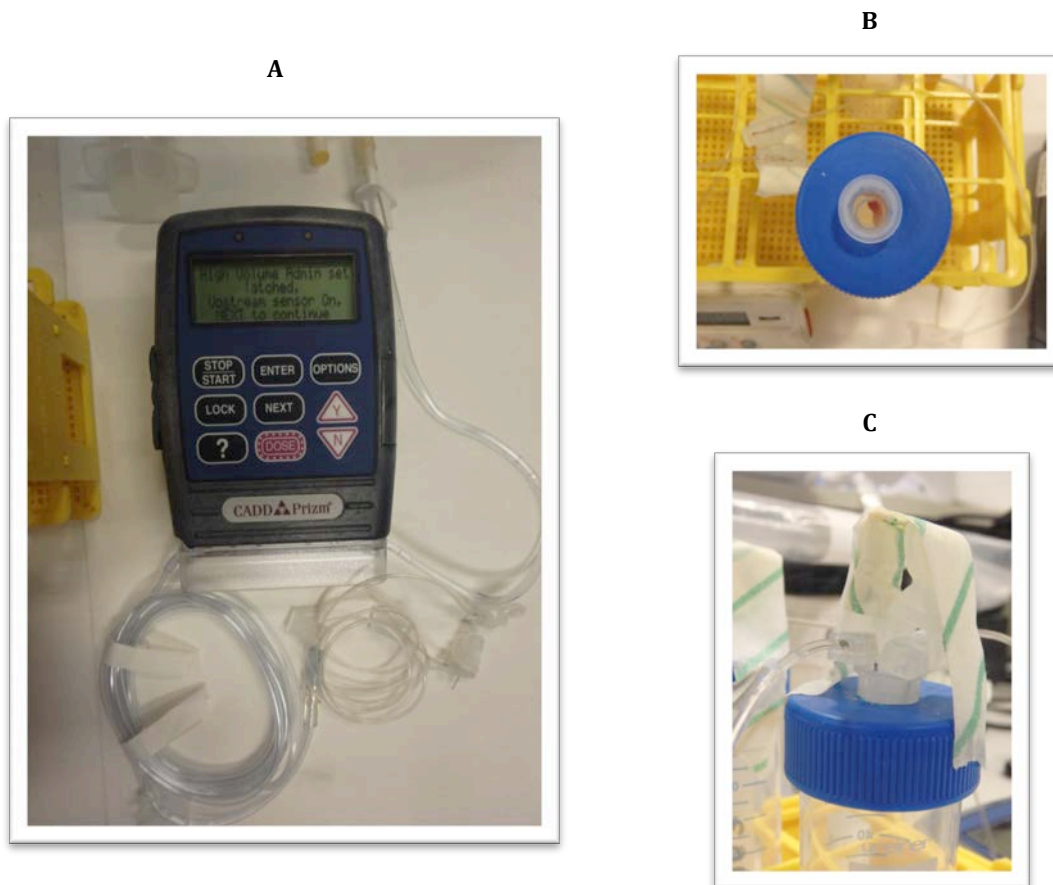
### 6.3. MÉTODO DE DISOLUCIÓN DE TEJIDO.

Se introdujo cada muestra de tejido pulpar en un tubo de centrifugación que contenía un filtro en su interior (Ultrafree-MC-HV, Merck Millipore, Alemania), al que se le había quitado previamente la membrana porosa. Este tubo de centrifugación se colocó en un tubo de plástico de 50 ml (Cellstar® , Greiner Bio-one, VWR, Pensilvania) para recolectar las soluciones aisladas de  $\text{NaOCl}$  y mezcladas de  $\text{NaOCl}$  con el agente quelante según grupo experimental.

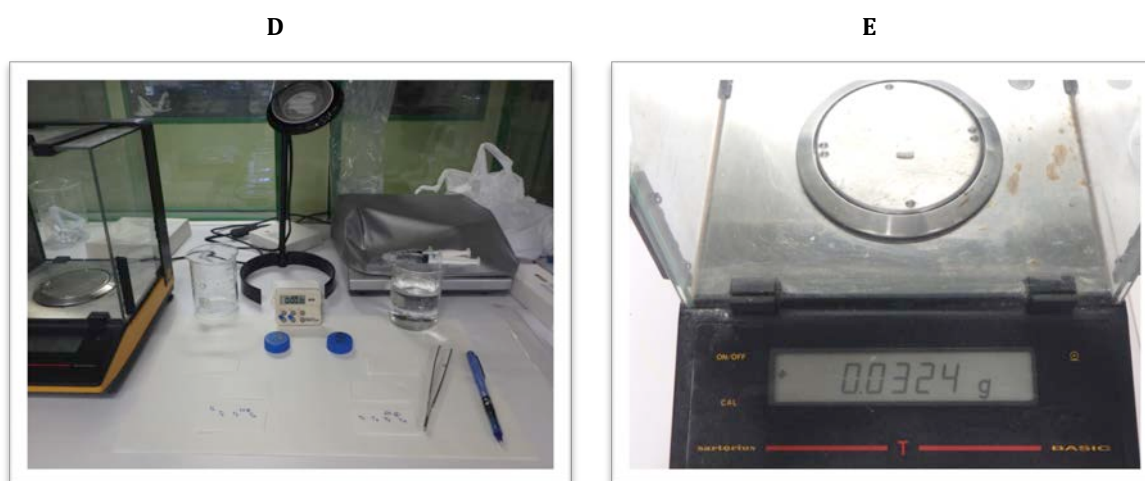
El agua destilada en el grupo control negativo y el  $\text{NaOCl}$  en el grupo control positivo y en todos los grupos experimentales fueron dispensados de forma continua con una bomba (CADD-Prizm® VIP, modelo 6101, Smiths Medical ASD, Inc, Minnesota, EE.UU) y una aguja de 9 mm de longitud y de calibre 24G bajo un flujo controlado continuo de 1ml/min. Se decidió este flujo para evitar la sobresaturación del filtro con la solución irrigadora. Una segunda bomba dispensó de forma alternante el  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  en G2 o el  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  (18%  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  en G3 y 9%  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  en G4) cada 30 segundos con el mismo flujo. Ambas agujas eran fijadas con cinta adhesiva en la tapa del tubo de plástico (**Figura 20**).

Las bombas se pararon después de 2 minutos de la dispensación de las soluciones. Las muestras de tejido se lavaron con 2 ml de agua destilada durante 30 segundos para neutralizar los efectos de las diferentes soluciones, se secaron con papel absorbente de nuevo como en la estandarización inicial (T0) y se volvieron a pesar para valorar el tejido remanente después de estos 2 minutos (T2). Este mismo procedimiento se realizó a los 5 (T5) y 10 (T10) minutos (**Figura 21**).

Con los pesos obtenidos, se calculó el porcentaje de tejido remanente en T2, T5 y T10 usando la siguiente fórmula:  $(100 - [(\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial}] * 100)$ .



**Fig.20. (A)** Bomba de dispensación. **(B)** Muestra de tejido pulpar bovino colocada en un tubo de centrifugación con un filtro interior al que previamente se le había eliminado la membrana porosa que posee para dejar pasar el irrigante. **(C)** Fijación de las agujas al tapón del tubo de plástico donde se recolectan las soluciones dispensadas.



**Fig.21. (D y E)** Medición del peso de tejido remanente en una balanza de precisión inicial y a los 2, 5 y 10 minutos de su exposición a las soluciones, previamente lavados y secados con papel absorbente.

#### 6.4. MEDICIÓN DE CLORO LIBRE, pH Y TEMPERATURA.

Para determinar el cloro libre disponible de una solución de  $\text{NaOCl}$  se utiliza la valoración yodométrica. Se trata de una valoración volumétrica de oxidación-reducción (redox). Es un método analítico muy empleado para conocer la concentración de una sustancia que puede actuar como oxidante o reductor en una disolución. Para ello, se emplea un indicador redox, en este caso el almidón ya que uno de sus componentes, la amilasa (polímero del azúcar) con el yodo forma un complejo azul intenso. El tiosulfato sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) decolora las disoluciones de yodo formando tetrionato.

Se seleccionaron de forma aleatoria tres muestras de cada grupo para hacer la valoración iodométrica usando el método de yodo/tiosulfato (201) para determinar su contenido en cloro libre y el pH en T0 y T10.

La valoración iodométrica se realizó en las soluciones de  $\text{NaOCl}$  (6% y 3%  $\text{NaOCl}$ ) en T0 y en las soluciones recolectadas (6%  $\text{NaOCl}$  en el grupo control, 3%  $\text{NaOCl}$  en G1, 3%  $\text{NaOCl}$  + 17%  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  en G2, 3%  $\text{NaOCl}$  + 18%  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  en G3 y 3%  $\text{NaOCl}$  + 9%  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  en G4).

##### Reactivos empleados: (Figura 22)

- Ácido acético glacial.
- Ioduro potásico puro (exento de iodato).
- Tiosulfato sódico N/10 (tiosulfato sódico pentahidratado 24,818 g y agua destilada 1000 ml).
- Solución de almidón (2,5 g en 250 ml de agua destilada).



**Fig.22.** Reactivos necesarios para hacer la valoración yodométrica de las soluciones que contienen  $\text{NaOCl}$ .

### Procedimiento:

En un matraz de Erlenmeyer de 250 ml colocado en una agitadora se añadieron 100 ml de agua destilada, como base de dilución de los reactivos añadidos. A continuación, se añadieron 5 ml de ácido acético glacial, 1 g de ioduro potásico, 500  $\mu\text{l}$  o 1000  $\mu\text{l}$  de dilución de  $\text{NaOCl}$  dependiendo de su concentración (6% o 3%), 300  $\mu\text{l}$  de solución de almidón y se tituló con tiosulfato sódico colocado en una bureta hasta la desaparición del color azul intenso del almidón, volviéndose el contenido del matraz transparente.

Se aplicó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de contenido de cloro:

$(\text{g/l}) = 0,355 \times N \times V / V'$ , siendo  $N =$  número de milímetros gastados de tiosulfato de sodio que caen de la bureta y  $V/V' =$  inversa de la disolución de  $\text{NaOCl}$ , siendo para 6%  $\text{NaOCl}$ , 20 y para el 3%  $\text{NaOCl}$ , 10.

También se determinó el pH inicial en  $T_0$  de cada solución ( $\text{NaOCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  y  $\text{Na}_4\text{HEBP}$ ) y el pH final en  $T_{10}$  de las soluciones recolectadas ( $\text{NaOCl}$  y la mezcla del  $\text{NaOCl}$  con el agente quelante) con un pHímetro (MicropH 2001, CRISON, Hach Lange, Spain, S.L.U.), el cual es un moderno pHímetro de laboratorio controlado internamente por un microprocesador y con un sistema autocalibrante, capaz de trabajar con compensación automática de temperatura.

Se registró la temperatura final en tres muestras seleccionadas aleatoriamente de las soluciones recolectadas (**Figura 23**).



**Fig.23.** Valoración del pH y de la temperatura de las soluciones recolectadas.

## **6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se realizó la estadística descriptiva tanto para el porcentaje de tejido remanente como para el resto de las variables (cloro libre, pH y temperatura) y se aplicó la estadística inferencial a los datos obtenidos empleando el paquete informático SPSS version 22.

Después de comprobar la distribución normal de los datos, se aplicó el test de ANOVA de medidas repetidas para detectar la diferencia en el porcentaje de tejido remanente a lo largo del tiempo y entre grupos aplicando la corrección de Greenhouse-Geiser porque no se cumplió la condición de esfericidad de los datos. Cuando el test de ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas, se aplicó el test post-hoc de Tukey para determinar la localización de las diferencias estadísticas.



## **7. RESULTADOS**



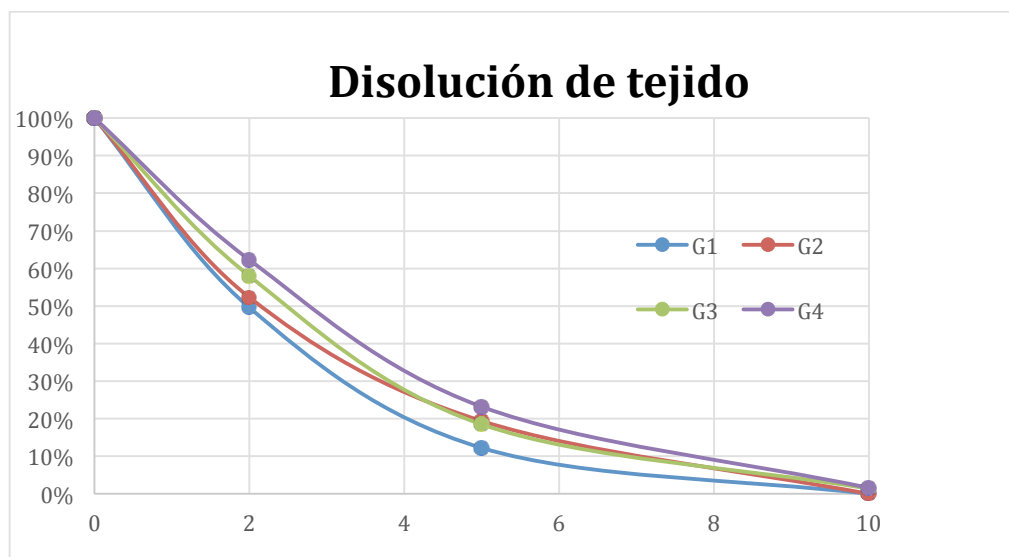
La media y las desviaciones estándar del **porcentaje de tejido remanente** a lo largo del tiempo de cada grupo se pueden ver reflejadas en la **Tabla 4** y **Figura 26**. La media del peso inicial (T0) de las muestras de tejido pulpar bovino fue de 31,98 mg (DE=1,18).

**Tabla 4.** Media y desviación estándar del porcentaje de tejido remanente en los grupos control y experimentales a lo largo del tiempo.

	Peso de tejido remanente (%)			
	Inicial	2 min (T2)	5 min (T5)	10 min (T10)
<b>NC: Agua destilada</b>	100	98,3 (0,4)	111,1 (5,1)	123,1 (6,3)
<b>PC: 6% NaOCl</b>	100	13,2 (2,3)	0	0
<b>G1: 3% NaOCl</b>	100	49,6 (14,3)	12,24 (9,3)	0
<b>G2: 3% NaOCl / 17% Na<sub>2</sub>EDTA</b>	100	52,3 (7,8)	19,4 (6,8)	0
<b>G3: 3% NaOCl / 18% Na<sub>4</sub>HEBP</b>	100	58 (10,7)	18,5 (9,8)	1,4 (2,4)
<b>G4: 3% NaOCl / 9% Na<sub>4</sub>HEBP</b>	100	62,3 (7,9)	23,2 (8,1)	1,6 (2,3)

En el grupo control negativo (NC, agua destilada) no se observó disolución de tejido y hubo un aumento en el porcentaje de peso debido a la absorción a lo largo del tiempo. En el grupo control positivo (PC, 6% NaOCl) no quedó tejido remanente a los 5 minutos (T5).

En todos los grupos experimentales hubo una reducción significativa en el porcentaje de tejido remanente a lo largo del tiempo ( $p < 0,001$ ). No hubo diferencias significativas en el porcentaje de pérdida de peso entre los grupos experimentales en ninguno de los tiempos, excepto para G4 (3% NaOCl/9% Na<sub>4</sub>HEBP) que mostró significativamente más cantidad de tejido remanente tanto en T2 como en T5 ( $p < 0,001$ ) que G1 (3% NaOCl), aunque no existieron diferencias significativas con G2 (3% NaOCl-17% Na<sub>2</sub>EDTA) y G3 (3% NaOC/18% HEBP). En T10 no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales; sin embargo, quedaron restos de tejido en G3 (m(DS)=1,4% (2,4)) y G4 (1,6% (2,3)); mientras que tanto en G1 como en G2 la disolución fue completa.



**Fig.24.** Evolución gráfica de la disolución de tejido de los grupos experimentales.

En la **Figura 24**, se observa como la dispensación de las soluciones de forma controlada hace que la curva que describe la disolución del tejido sea progresiva a lo largo del tiempo, debido a que no hay una pérdida del cloro libre (**ver Tabla 5**) debido a la renovación constante de la solución.

La **Tabla 5** muestra el porcentaje de **cloro libre** inicial de las soluciones aisladas de  $\text{NaOCl}$  y final de las soluciones recolectadas ya mezcladas.

**Tabla 5.** Cloro libre de las diferentes soluciones que contenían  $\text{NaOCl}$ .

Grupo	Componentes	% Inicial	Cloro libre	
			% Final	% Remanente
PC	6% $\text{NaOCl}$	6,4	6,4	100
G1	3% $\text{NaOCl}$	3,9	3,8	97,4
G2	3% $\text{NaOCl}$	3,9	-	-
	3% $\text{NaOCl}$ + 17% $\text{Na}_2\text{EDTA}$	-	1,7	43,6
G3	3% $\text{NaOCl}$	3,6	-	-
	3% $\text{NaOCl}$ + 18% $\text{Na}_4\text{HEBP}$	-	2,4	66,7
G4	3% $\text{NaOCl}$	3,6	-	-
	3% $\text{NaOCl}$ + 9% $\text{Na}_4\text{HEBP}$	-	2,2	61,1

El cloro libre no cambió en las soluciones aisladas recolectadas en PC y G1. Sin embargo, se observó una reducción del cloro libre en las soluciones recolectadas mezcladas ( $\text{NaOCl}$  con agente quelante) en T10. En el G2, la reducción del cloro libre fue

del 54,4%, en el G3 del 33,3% y en el G4 del 38,9%. Tanto el Na<sub>2</sub>EDTA como el Na<sub>4</sub>HEBP disminuyeron el cloro libre a los 10 minutos en las soluciones mezcladas con NaOCl.

La media y desviación estándar del **pH** inicial de las soluciones aisladas y el pH final y la **temperatura** final de las soluciones recolectadas se pueden ver reflejadas en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Temperatura final y pH inicial y final de los diferentes grupos.

Grupo	Componentes	Temperatura (°C)		pH	
		Final (T10)	Inicial (T0)	Final (T10)	
PC	6% NaOCl (10 ml)	25	12,89	12,92	
G1	3% NaOCl (10 ml)	25,33 (0,6)	12,81	12,77	
G2	3% NaOCl (10 ml)	-	12,81	-	
	17% Na <sub>2</sub> EDTA (5ml)	-	8,57	-	
	NaOCl + Na <sub>2</sub> EDTA (15ml)	35	-	9,47	
G3	3% NaOCl (10ml)	-	12,81	-	
	18% Na <sub>4</sub> HEBP (5ml)	-	10,93	-	
	NaOCl + Na <sub>4</sub> HEBP (15ml)	26,67 (0,6)	-	12,70	
G4	3% NaOCl (10 ml)	-	12,81	-	
	9% Na <sub>4</sub> HEBP (5ml)	-	11,13	-	
	NaOCl + Na <sub>4</sub> HEBP (15ml)	27,33 (0,6)	-	12,63	

En la solución recolectada mezclada en G2 (3% NaOCl + 17% Na<sub>2</sub>EDTA) se observó una reducción del pH inicial de la solución de 3% NaOCl aislado, la presencia de burbujas debido a la formación de gas cloro y un aumento de la temperatura (35°C). Esta reacción exotérmica no se observó en el resto de los grupos. Además, el filtro que contenía la muestra de tejido presentó un precipitado de la sal al final del experimento.



## **8. DISCUSIÓN**



En este estudio se ha valorado la capacidad de disolución de la combinación del NaOCl con dos agentes quelantes sin ser previamente mezclados: Na<sub>2</sub>EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetracético) y Na<sub>4</sub>HEBP (sal tetrasódica del ácido etidróico) mediante un flujo continuo controlado sobre tejido pulpar bovino. Se discutirá el método y los resultados por separado para facilitar la lectura de esta tesis doctoral.

## **8.1. DISCUSIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS.**

Los aspectos más relevantes cuando se compara el método empleado para la realización de esta tesis doctoral con otros estudios publicados al respecto son los relativos al tipo de tejido empleado y su estandarización, las soluciones irrigadoras utilizadas y fundamentalmente el modelo de estudio mediante un flujo continuo y controlado que se propone en esta tesis doctoral.

### **8.1.1. TIPO DE TEJIDO Y ESTANDARIZACIÓN.**

Aunque en la práctica clínica el tejido a disolver es el tejido pulpar humano, los trabajos de investigación sobre capacidad de disolución de irrigantes en Endodoncia han empleado **diferentes tipos de tejidos** en cuanto a su **origen** (animal (23, 24, 26, 54-64, 66-69, 71-76, 78-95, 202) o humano (44-53, 77)), **localización** (pulpa (23, 26, 44-55, 57-64, 66-69, 71-75) , cordón umbilical (77), tendón (56, 78), encía (56), músculo (39, 79-85, 87, 202), mucosa palatina (24, 37, 86, 88-91), hígado (92) y subcutáneo o dérmico (93-95) y **estado** (vital, necrótico, fijado con paraformaldehído, liofilizado, triturado o mezclado) (55, 57, 59, 63, 86, 95) para evaluar la capacidad de disolución de diversas soluciones ya sea de forma aislada (23, 24, 26, 44-49, 53-56, 58-65, 69, 71, 75, 77-79, 81-83, 86-88, 93, 95, 107) o combinada mezclada (39, 67, 73, 84, 85, 202) o sin mezclar (50, 89, 90).

La selección de tejidos es de suma importancia en este tipo de estudios y afecta a los resultados encontrados en ellos en cuanto a la capacidad de disolución de los irrigantes.

A continuación, se detallan los tipos de tejido que se han empleado en los diferentes trabajos de investigación sobre la capacidad de disolución de irrigantes en Endodoncia, siendo el más utilizado el tejido pulpar bovino.

**Tabla 7.** Tipos de tejido para estudiar la capacidad de disolución de diferentes soluciones.

TIPO	ORIGEN		LOCALIZACIÓN	AUTORES
<b>TEJIDO PULPAR</b>	HUMANO		Pulpa	Senia 1971 (44) Trepagnier 1977 (45) Rosenfeld 1978 (46) Sirtes 2005 (47) Ballal 2011 (48) Singh 2012 (49) De-Deus 2013 (50) Slutzky-Golberg 2013 (51) Taneja 2014 (52) Cullen 2015 (53)
	ANIMAL	BOVINO	Pulpa	Koskinen 1980 (54) Gordon 1981 (55) Morgan 1991 (57) Spanó 2001 (58) Beltz 2003 (59) Okino 2004 (23) Khademi 2007 (60) Rossi-Fedele 2008, 13 (61) (62) Al-Jadaa 2009 (63) (64) Cobankara 2010 (66) Irala 2010 (67) Jungbluth 2012 (68) Malentacca 2012 (69) Guneser 2015 (71) Arslan 2015 (26) De Almeida 2013, 15 (72) (73) Niewierowski 2015 (74) Tanomaru-Filho 2015 (75)
		PORCINO	Pulpa	Clarkson 2012 (76)
<b>OTROS TEJIDOS NO PULPARES</b>	HUMANO		Cordón umbilical	Johnson 1993 (77)
	ANIMAL	BOVINO	Tendón	Cunningham 1980 (78) Nakamura 1985 (56)
			Encía	Nakamura 1985 (56)
			Músculo	Stojicic 2010 (79) Haapasalo 2014 (80) Ertugrul 2014,15 (81) (82) Tartari 2015,6,7 (39) (83) (84) Tejada 2018 (203)
		PORCINO	Músculo	Hasselgren 1988 (85) Christensen 2008 (87)
			Mucosa	Zehnder 2002 (86) Grawher 2003 (37) Naenni 2004 (24) Jungbluth 2011 (88) Conde 2017 (89) Estévez 2017 (90) Peña 2018 (91)
		CONEJO	Hígado	Moorer 1982 (92)
RATA	Subcutáneo	Hand 1978 (93) Thé 1979 (94) Abou-Rass 1981 (95)		

En cuanto a su **origen** además del **tejido pulpar humano** (44-53), se han empleado tejidos pulpares **bovino** (23, 26, 54-69, 71-75) y **porcino** (76, 120), así como otro tipo de **tejidos no pulpares de origen humano** (77) y **animal bovino** (39, 56, 78-84, 203), **porcino** (24, 37, 85-91), **conejo** (92) y **rata** (93-95).

En función de la **localización** del tejido empleado se ha observado que la mucosa porcina (24, 86, 88) y la encía bovina (56), al ser un tejido denso epitelializado con alto contenido de fibras conectivas, se disuelven peor que la pulpa, requiriendo incluso el triple de tiempo de actuación del NaOCl que cuando se emplea tejido pulpar para una misma proporción masa/líquido (24, 86, 88).

Sin embargo, si consideramos el **estado** del tejido, no se encontraron diferencias significativas entre tejido vital o necrótico en pulpa bovina (55) o mucosa palatina porcina (86). Sin embargo, cuando se ha utilizado tejido conectivo de rata se ha observado que el tejido fresco se disuelve más rápidamente, seguido del necrótico y por último, el tejido ya fijado (95).

También se ha propuesto como sustrato orgánico la matriz de colágeno, que se disuelve de forma similar al tejido pulpar bovino (107) y el tejido pulpar liofilizado (59).

En esta tesis doctoral se utilizaron **dientes de origen bovino** para la obtención del tejido pulpar ya que presentan mayores similitudes con los dientes humanos que otras especies (ovina y porcina) en cuanto a composición química se refiere (204). Morfológicamente, la dentina bovina presenta mayor número de túbulos y difiere en la densidad de los mismos, pero su diámetro en todos los tercios radiculares es parecido tanto en dientes permanentes como deciduos (205, 206). El uso de dientes bovinos parece por tanto adecuado para este tipo de estudios, aunque se ha visto que no es buen sustituto para otros, como es el caso de estudios que analizan contaminación de endotoxinas (207). Se utilizaron como alternativa a dientes humanos, ya que el uso de dientes humanos presenta ciertas limitaciones en cuanto a la obtención de una muestra suficiente, de calidad y homogénea, puesto que es difícil controlar su procedencia, la edad dentaria y su estandarización. Además, los dientes bovinos han sido empleados ampliamente en diferentes estudios científicos dentales debido a su disponibilidad, tamaño, composición uniforme, ausencia de caries y aspectos éticos (204, 205).

Aunque no hay que descartar que entre los dientes humanos y bovinos existen diferencias en su morfología, composición química y sus propiedades físicas y que los resultados de una revisión con respecto al tema no fueron consistentes (208).

En cuanto a **tejido pulpar** se refiere, al comparar el tejido pulpar humano con el bovino, el primero presentó un mayor contenido orgánico (siendo mayor en tejido vital que necrótico) y el tejido pulpar bovino una mayor proporción de colágeno (no observándose diferencias entre tejido vital y necrótico). Las evidencias tanto cualitativas como cuantitativas del estudio de extracción de componentes orgánicos de ambos tejidos de Salas y cols en 2011 (43) validaron el modelo bovino para investigaciones endodónticas (**Tabla 8**). Además, el tamaño de la pulpa humana de un diente individual no hubiera permitido la realización del estudio.

**Tabla 8.** Parámetros químico-orgánicos evaluados en extractos de pulpa dental humana y bovina tanto vital como necrótica tomados de Salas y cols, 2011 (43).

Extracto	Proteínas totales (x±DE)			Hidroxiprolina (x±DE)			Azúcares totales (x±DE)		
	mg/dL	mg/mL extracto	mg/mg tejido	mg/dL	mg/mL extracto	µg/mg tejido	mg/dL	mg/mL extracto	mg/mg tejido
Humana vital	670,4 ± 0,11	1,67 ±0,15	0,033 ±0,001	0,70 ±0,05	0,0017 ±0,0005	0,035± 0,0021	45,03 ±0,011	0,1126 ±0,035	0,0022 ±0,0003
Humana necrótica	380,5 ±0,33	0,90 ±0,09	0,025 ±0,005	0,60 ±0,08	0,0015 ±0,0001	0,021± 0,0015	40,07 ±0,021	0,1010 ±0,028	0,0012 ±0,0005
Bovina vital	390,2 ±0,41	0,97 ±0,13	0,023 ±0,002	0,48 ±0,11	0,0012 ±0,0008	0,023± 0,0016	9,04 ±0,009	0,0226 ±0,061	0,0005 ±0,0001
Bovina necrótica	395,1 ±0,86	0,99 ±0,10	0,024 ±0,001	0,51 ±0,09	0,0012 ±0,0003	0,028± 0,0022	7,01 ±0,007	0,0189 ±0,039	0,0005 ±0,0001

Otro aspecto importante en ese apartado es lo referente a la **conservación y estandarización del tejido** a emplear.

- **Conservación de dientes extraídos:**

En la literatura científica se han descrito diferentes métodos y sustancias para su desinfección y conservación: 70% etanol (45), 10% formalina (46, 50), 0,1% timol (12, 13, 36, 88, 90, 209), 0,5% cloramina T (53), agua destilada con 0,2% azida sódica (41, 48) y 0,9% solución salina (47, 58). En nuestro estudio los dientes bovinos extraídos se conservaron en timol 0,1%.

- **Obtención del tejido pulpar:**

Para la obtención del tejido pulpar independientemente del origen del mismo, se puede partir longitudinalmente el diente por la mitad (2, 23, 47, 48, 53, 59, 61, 67) o cortar la corona y/o el ápice para extirpar el tejido pulpar con una lima o con la ayuda de unas pinzas sin dientes para no lacerarlo (26, 58, 72, 73) o de forma más rudimentaria machacando la raíz envolviendo al diente con un dique de goma (76). En nuestro estudio, los dientes bovinos se cortaron por la corona y el ápice mediante microtomo para facilitar la obtención del tejido pulpar.

- **Conservación de la pulpa extirpada:**

Los diferentes estudios proponen distintos métodos para preservar el tejido hasta su uso, ya sea mediante congelación con nitrógeno líquido para poder cortar el tejido en pequeños fragmentos, pero puede afectar a su solubilidad (63, 64), en seco entre -16 y -27°C (24, 57, 73, 89, 90) o al 100% humedad (79, 81, 82); otros lo mantienen también al 100% de humedad pero en nevera (48, 67, 85).

En nuestro estudio, el tejido pulpar se conservó congelado hasta 6 meses a -20°C al 100% de humedad hasta su uso. Después se descongelaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos como hicieron otros autores (24, 26, 47, 73). Algunos autores (89, 90) que los congelaron en seco, a la hora de descongelarlos les añadieron 0,5 ml de suero salino.

- **Estandarización de la muestra de tejido pulpar bovino:**

En la literatura científica se han sugerido diferentes formas de estandarización. Algunos autores han triturado previamente el tejido (54), liofilizado (59) o mezclado (57, 66, 71). Otros autores han preferido estandarizar las dimensiones y/o peso del tejido pulpar original (23, 25, 26, 54-58, 60, 61, 65, 67, 71-73).

En nuestro estudio, se utilizaron pulpas enteras a diferencia de otros autores (57, 63, 66, 70, 71) que hicieron una masa homogénea mezclando diferentes pulpas para randomizar la muestra y que no hubiese diferencias entre ellas. Además, todas las dimensiones fueron estandarizadas (longitud, anchura y espesor) al igual que el peso a diferencia de otros estudios (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Proporción peso/volumen del tejido a disolver en soluciones.

Autores	Tipo de tejido	Peso	Dimensiones	Volumen
Hand 1978 (93)	Tejido conectivo rata	74 mg	Ø 13 mm	1ml /10mg
Abou-Rass 1981 (95)	Tejido conectivo rata	-	2mmxØ 8 mm	30 ml
Morgan 1981 (57)	Tejido pulpar bovino	90 mg	-	11,25 ml
Hasselgren 1988 (85)	Músculo porcino	20 mg	2x1x1 mm	20 ml
Johnson 1993 (77)	Cordón umbilical humano	-	Ø 1,5 mm	20 ml
Zehnder 2002 (86)	Mucosa palatina	80±5 mg	Ø 5 mm	30 ml
Beltz 2003 (59)	Tejido pulpar bovino	20-25 mg	-	1,7 ml
Naenni 2004 (24)	Mucosa palatina	83±9 mg	Ø 5 mm	30 ml
Okino 2004 (23)	Tejido pulpar bovino	29 mg	-	20 ml
Christensen 2008 (87)	Músculo porcino	40-100 mg	-	10 ml
Camps 2009 (65)	Tejido pulpar bovino	100 mg	-	1 ml
Stojicic 2010 (79)	Músculo bovino	68 ± 3 mg	4x4x2 mm	10 ml
Irala 2010 (67)	Tejido pulpar bovino	-	5 mm longitud	4 ml
Jungbluth 2011 (88)	Mucosa palatina	205±5 mg	Rectangular	1,5 ml
Ballal 2011 (48)	Tejido pulpar humano	26 mg	-	5 ml
Singh 2012 (49)	Tejido pulpar humano	15 mg	-	5 ml
Clarkson 2012 (76)	Tejido pulpar porcino	-	Ø 2,5 mm	25 ml
Rossi-Fedele 2013 (62)	Tejido pulpar bovino	13 mg	-	1,5 ml
Couto Oliveira 2013 (25)	Tejido pulpar bovino	10 mg	5 mm	5 ml
Ertugrul 2015 (82)	Músculo bovino	38±1 mg	Ø 5 mm	10 ml
Arslan 2015 (26)	Tejido pulpar bovino	6,5 mg	-	0,1 ml
de Almeida 2015 (73)	Tejido pulpar bovino	45±15 mg	-	2 ml
Cullen 2015 (53)	Tejido pulpar humano	-	Ø 2mm	2 ml
Tartari 2015 (39)	Músculo bovino	55 mg	2x2x6 mm	15 ml
Tartari 2016 (83)	Músculo bovino	55 mg	2x2x6 mm	10 ml
Tanomaru 2015 (75)	Tejido pulpar bovino	25±2 mg	-	4 ml
Tejada 2018 (203)	Músculo bovino	30±1,8 mg	2x2x4 mm	1 ml

Como se puede observar en la **Tabla 9**, algunos autores estandarizaron las dimensiones y el peso de las muestras de tejido como en nuestro estudio; mientras que otros, sólo uno de los dos parámetros existiendo gran variedad en el tamaño (desde Ø 1,5 mm hasta 13 mm), en el peso de las muestras (desde 10 mg hasta 205 mg) y en el volumen de las soluciones donde se sumergían estas (desde 0,1 ml hasta 30 ml).

Gordon y cols en 1981 (55) afirmaron que el área de superficie del tejido expuesto al NaOCl era un factor a tener en cuenta en el grado de disolución, observando que cuando la pulpa alcanzaba 50 mg/ml disminuía el porcentaje de pulpa disuelta (60%) a los 10 minutos cuando era comparada con una concentración de pulpa de 10 mg/ml (73%) o 20 mg/ml (74%).

Si nos centramos en los estudios de disolución que emplean el tejido pulpar bovino como en nuestro caso, lo que se suele estandarizar es el peso sin tener en cuenta sus dimensiones (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Estandarización del tejido pulpar bovino de los estudios sobre capacidad de disolución.

Autores	Dimensiones	Peso
Koskinen 1980 (54)	-	100 mg
Gordon 1981 (55)	-	5 mg
Nakamura 1985 (56)	-	10 mg
Morgan 1991 (57)	-	90 mg
Spanó 2001 (58)	10 mm	-
Beltz 2003 (59)	-	20-25 mg
Okino 2004 (23)	-	29,25 mg
Khademi 2007 (60)	-	80 mg
Rossi-Fedele 2008 (61)	-	8-10 mg
Camps 2009 (65)	-	100 mg
Irala 2010 (67)	5 mm	-
Cobankara 2010 (66)	-	25 mg
Malentacca 2012 (69)	-	-
Jungbluth 2012 (68)	No especifica	No especifica
De Almeida 2013 (72)	-	45 mg
Couto de Oliveira 2013 (25)	5 mm	10 mg
Arslan 2015 (26)	-	6,5 mg
Tanomaru-Filho 2015 (75)	-	25 mg
Guneser 2015 (71)	-	45 mg
Niewierowski 2015 (74)	10 mm	0,006 mg
Tesis Navarrete 2018	1x3x10mm	31,98 mg

En nuestro estudio, los especímenes en todos los grupos experimentales tenían dimensiones y pesos iniciales similares (1x3x10mm, media=31,98 mg, desviación estándar=1,18 mg) puesto que el área de contacto y la proporción tejido/solución son factores que influyen en la disolución (55, 92). Para ello, se confeccionó una probeta con papel milimetrado y control de espesores y posteriormente, se confirmó con un calibre digital, descartando la pulpa más apical y coronal y quedándonos con la parte central del tejido. Otros autores (24, 26, 58, 61, 88, 93) utilizaron para estandarizar el área de superficie un bisturí o un punch de diferentes dimensiones, pero se observó que el

empleo de estos instrumentos permite un control preciso de la longitud y el diámetro del espécimen, pero no así del espesor de la muestra de tejido (**Figura 25**).

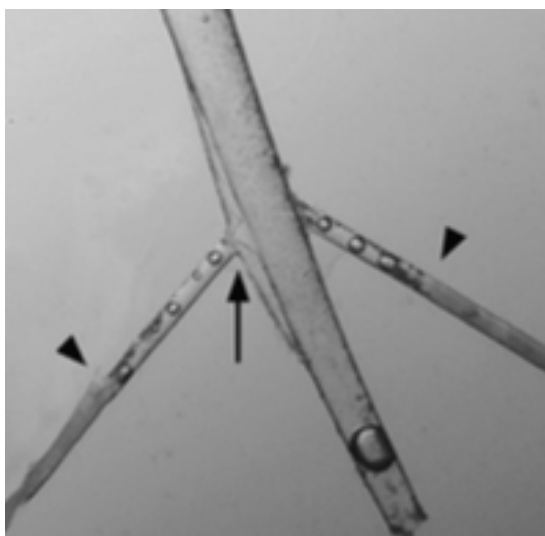


**Fig.25.** Tejido pulpar humano estandarizado con punch de biopsia tomado de Cullen y cols, 2015 (53).

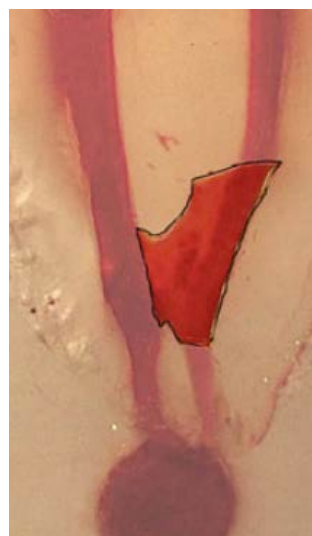
Tartari y cols (39) también estandarizaron en su estudio todas las dimensiones (2x2x6 mm) y el peso inicial (aproximadamente 55 mg), pero a diferencia de nuestro estudio, ellos emplearon tejido muscular bovino en lugar de pulpar. Como hemos visto anteriormente, el origen del tejido influye en el tiempo de disolución de este; además, como veremos en el apartado siguiente de esta discusión, sumergieron las muestras de tejido en soluciones sin renovarlas. Todo ello pudo influir en los resultados que encontraron.

En esta tesis doctoral, además, para intentar controlar mejor otros posibles factores confundidores relativos a diferencias individuales entre los animales portadores, las muestras de la misma mandíbula bovina se distribuyeron aleatoriamente entre todos los grupos de trabajo.

**En cuanto a la colocación del tejido a estudiar**, en nuestro estudio el tejido pulpar bovino estandarizado se depositó sobre la rejilla del tubo de centrifugación para dejar paso a los irrigantes exponiendo el tejido directamente a las soluciones, pero no sumergiéndolo en ellas. En cambio, otros autores introdujeron el tejido en ranuras artificiales confeccionadas en moldes de plástico (63, 64, 69) (**Figura 26**), en dientes transparentizados (64) (**Figura 27**) o en dientes humanos extraídos previamente cortados longitudinalmente y luego, ensamblados de nuevo para poder introducir el tejido estandarizado ya que en los estudios anteriores no se puede controlar la densidad de este y para que el sustrato sea dentina como ocurre en la práctica clínica (89, 90) (**Figura 28**). También se ha introducido el tejido en el interior de una jeringa mientras que el  $\text{NaOCl}$  circulaba a través de ella (58). Además, en otros estudios se ha aprovechado el tejido pulpar presente en los dientes vitales que iban a ser extraídos por motivos ortodóncicos (44, 46, 50). La ventaja de emplear el tejido pulpar de los dientes vitales es que se acerca más a la realidad clínica y se puede valorar la eliminación de tejido tanto durante la instrumentación como en el protocolo de irrigación final, pero existe una gran dificultad en la estandarización y con ello un desafío a la validez interna del estudio. Por un lado, no es posible estimar la cantidad de tejido inicial que existe en el interior del diente, y por otro el tejido varía de un diente a otro, por lo que no todas las muestras parten de una situación inicial comparable.



**Fig.26.** Molde de plástico tomado de Al-Jadaa y cols, 2009 (63, 64).



**Fig.27.** Diente transparentizado tomado de Malentacca y cols, 2018 (70).



**Fig.28.** Ranura artificial de 2x2x4 mm realizada con fresa redonda de 2 mm en un diente previamente instrumentado y partido longitudinalmente en dos tomado de Conde y cols, 2017 (89).

### **8.1.2. SOLUCIONES IRRIGADORAS.**

El uso del  $\text{NaOCl}$  seguido por EDTA es el protocolo convencional más empleado (3) aunando el efecto solvente de la materia orgánica e inorgánica en la fase de irrigación final. En este estudio, se introdujo el grupo de  $\text{NaOCl}$  y HEBP porque se está intentando establecer como alternativa al EDTA para evitar la acumulación de restos dentinarios durante la instrumentación.

No sólo el tipo de soluciones irrigadoras, sino también las condiciones de conservación de las mismas pueden influir en los resultados de los diferentes estudios. Las **soluciones** se mantuvieron en sus botellas opacas y a temperatura ambiente entre 18-30°C siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

#### **a. $\text{NaOCl}$ .**

Un factor a tener en cuenta es la concentración del  $\text{NaOCl}$ . Las concentraciones del  $\text{NaOCl}$  se obtuvieron directamente del fabricante sin tener que hacer las diluciones a diferencia de otros estudios (88). La concentración de las soluciones comerciales de  $\text{NaOCl}$  representan su contenido de cloro libre, pero se pudo comprobar que en nuestro caso el contenido de cloro libre inicial en T0 era algo mayor, siendo de 6,4% para el comercializado como 6%  $\text{NaOCl}$ , y de entre 3,6-3,9% para el supuesto 3%  $\text{NaOCl}$ . El pH de las soluciones comerciales de  $\text{NaOCl}$  era de 12, con lo que supuestamente presentaban una gran capacidad de disolución al tener el cloro activo en forma de ión hipoclorito.

Las condiciones de conservación en cuanto a temperatura y exposición a la luz pueden producir una pérdida del cloro libre. En cuanto a temperatura se refiere, Pécora y cols (123) no encontraron relación entre la pérdida de cloro libre y las condiciones de temperatura (en su caso, temperatura ambiente o refrigeración a 9°C). En muchos estudios, las soluciones se conservan en la nevera (entre 4 y 9°C), pero después se dejan a temperatura ambiente aproximadamente 1 hora antes de uso (36, 47, 58, 72, 76, 83). En nuestro caso, las soluciones de NaOCl fueron almacenadas a temperatura ambiente según las indicaciones del fabricante y como se suelen mantener en la práctica clínica. Para evitar los efectos de la exposición a la luz, en nuestro estudio las bolsas de dispensación en las que se introdujeron las soluciones de NaOCl a las diferentes concentraciones (6% y 3%) se envolvieron en papel aluminio.

#### **b. Soluciones quelantes.**

Hay que matizar en este apartado que hemos encontrado en la bibliografía consultada lo que a nuestro juicio es un error muy común. Se emplea indistintamente el término de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) cuando lo que realmente se emplea es la sal de ese ácido sin tener en cuenta que se trata de dos sustancias diferentes y que su comportamiento difiere dependiendo del tipo de sal que sea (sal disódica Na<sub>2</sub>EDTA, trisódica Na<sub>3</sub>EDTA o tetrasódica Na<sub>4</sub>EDTA de ese ácido) (36, 172). De ahí la importancia de especificar este aspecto en la metodología de los estudios.

En la mayoría de estudios sobre disolución de tejido no se especifica el tipo de sal del EDTA utilizada en la metodología aunque sí su concentración, que suele ser del 17%. Esto ocurre por ejemplo, en los estudios de Beltz y cols (59) y Ballal y cols (48) donde el EDTA se emplea de forma aislada para valorar su capacidad de disolución o en otros estudios donde se mezcla con diferentes concentraciones de NaOCl en proporción 1:1 (73) o en diferentes proporciones (67). Aunque en los estudios más recientes de Tartari y cols (39, 84), donde también se estudia la interacción de las soluciones mezcladas NaOCl-EDTA sobre la capacidad de disolución del NaOCl, sí especifican el tipo de sal. Tartari y cols en su estudio de 2015 emplean la sal disódica del EDTA (Na<sub>2</sub>EDTA) al 17% y en el de 2017, la sal trisódica (Na<sub>3</sub>EDTA) al 17% y la tetrasódica (Na<sub>4</sub>EDTA) del EDTA a dos concentraciones diferentes, 10% y 20%.

En esta tesis doctoral se empleó la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (Na<sub>2</sub>EDTA) al 17% puesto que se trata de un quelante fuerte que interacciona de forma negativa con el NaOCl al ser mezclado de forma inmediata (36, 37, 39, 84, 144, 145, 171) pero no se ha estudiado lo que ocurre cuando es dispensado de forma alternante con el NaOCl en cuanto a la capacidad de disolución de este. El Na<sub>2</sub>EDTA empleado ya estaba preparado comercialmente para su uso directo.

Con el HEBP ocurre lo mismo que con el EDTA. Se emplea indistintamente el término de ácido etidróico y etidronato cuando lo que realmente se utiliza es la sal tetrasódica del ácido etidróico (181, 203). Fue elegido como quelante débil de reciente aparición, el cual se había visto que no interfería negativamente con el NaOCl al ser mezclado (36, 39). Aunque recientemente se ha comercializado para uso endodóntico (178), cuando se hizo la fase experimental no estaba disponible. Así que se utilizaron los gránulos de la sal tetrasódica del ácido etidróico disueltos en agua destilada, teniendo en cuenta que la parte activa de la sal era del 85% para obtener las dos concentraciones del 18% y 9% del Na<sub>4</sub>HEBP, aspecto que no especifican otros autores (39, 203).

Las partículas de la sal de HEBP no se tamizaron como lo hicieron Biel y cols (172), los cuales utilizaron en su estudio las que tenían una fracción entre 300-500 µm puesto que tenían un objetivo diferente al nuestro, que era conocer la disolución máxima de la sal en agua.

### **c. Agua destilada como irrigante en el grupo control negativo.**

Se empleó como grupo control negativo el agua destilada al igual que en otros estudios (23, 52, 55, 72, 73, 89-91) y se confirmó que no tiene capacidad de disolución. No se empleó suero salino porque este último ha sido cuestionado ya que en el estudio de Morgan y cols en 1991 (57), el suero salino isotónico disolvió el 10,5% de tejido pulpar bovino y en el de Beltz y cols en 2003 (59), el 62%. Se especula que el causante pudiera ser el ión cloruro del suero salino (57) o en el caso de Beltz y cols (59) el tejido que estaba liofilizado. Aunque el suero salino ha sido utilizado después por otros autores (24, 39, 47, 53, 65, 66, 85) como grupo control sin tener ninguna capacidad de disolución.

### **8.1.3. MODELO DE ESTUDIO MEDIANTE FLUJO CONTROLADO Y CONTINUO.**

Se ha estudiado la capacidad de disolución de diferentes soluciones como el NaOCl (44, 45, 47, 55, 56, 58, 59, 61, 63, 65, 71, 77, 78, 81, 83, 86, 87, 93, 95, 107, 203), agentes quelantes (MTAD, EDTA, ácido maleico, ácido cítrico, HEBP) (26, 39, 48, 59, 60, 67, 73, 84, 203), clorhexidina (24-26, 202) e hidróxido de calcio (57, 85, 202) de forma aislada (44, 45, 47, 55, 56, 58, 59, 61, 63, 65, 71, 77, 78, 81, 83, 86, 87, 93, 95, 107, 203), alternante (50, 89, 90) o mezcladas (39, 67, 73, 84).

Quizás el aspecto más novedoso de esta tesis doctoral es el modelo de estudio que se propone para valorar la capacidad de disolución de los irrigantes mediante un flujo continuo y controlado.

En nuestro estudio se utilizó la combinación del NaOCl con EDTA empleándolos de forma simultánea, pero sin pre-mezclar, a diferencia de otros autores (39, 67, 73).

Irala y cols en 2010 (67) estudiaron la disolución completa de tejido pulpar bovino cuando se sumergía en soluciones donde previamente se había mezclado el NaOCl y el EDTA a diferentes proporciones. Tartari y cols en 2015 (39) estudiaron la disolución parcial (a los 5, 10 y 15 minutos) de tejido muscular bovino cuando se sumergía en soluciones donde se mezclaba el NaOCl con el quelante, EDTA o HEBP en proporción 1:1. De Almeida y cols en 2015 (73) valoraron también la disolución parcial (a los 5, 15 y 30 minutos) pero de tejido pulpar bovino sumergido en diferentes concentraciones de NaOCl mezcladas con 17% EDTA (1:1) en presencia o ausencia de dentina.

Las muestras de tejido no se sumergieron en las soluciones como hacen la mayoría de autores con ausencia o presencia de dentina (en forma de polvo, discos, barras o reservorios de dentina) (23, 26, 39, 61, 66, 67, 73, 75, 76, 83, 84, 91, 203) o recambiando las soluciones cada cierto tiempo (44-47, 57, 58, 60) sino que las soluciones fueron dispensadas con un flujo controlado y continuo.

Por tanto, en esta tesis doctoral se optó por estudiar las soluciones (NaOCl y quelante) de forma combinada, pero sin mezclarlas, dispensándolas a un flujo controlado continuo o alternante de 1ml/min con un volumen total a los 10 minutos de 10 ml de NaOCl y 5 ml de quelante (EDTA o HEBP) directamente sobre el tejido pulpar bovino. Este flujo fue empleado en el estudio de Cobankara y cols (140) para estudiar el efecto sobre dentina de varios quelantes durante 5 minutos. De-Deus y cols (50) aplicaron un flujo diferente de 3 ml/min con la aguja 30 G colocada en el interior del conducto radicular a 2 mm de la longitud de trabajo pero evaluaron sólo la capacidad de disolución del NaOCl con o sin surfactante pero sin alternar ningún quelante durante la preparación mecánica (18 ml NaOCl) y en la irrigación final empleando 12 ml de NaOCl seguido de 3 ml de 17% EDTA y 3 ml de agua destilada. Estévez y cols (90) y Conde y cols (89) emplearon un flujo de 6 ml/min durante el protocolo de irrigación final. Sirtes y cols (47) emplearon un flujo diferente de 5 ml/min. En estos casos en los que se introduce la aguja en el interior del conducto hay que tener en cuenta la profundidad de la aguja, su diámetro y la orientación del bisel de la aguja.

A diferencia de los anteriores autores, en el estudio de Al-Jadaa y cols (64) el reservorio donde estaba el tejido a disolver era diferente, dispensándose el NaOCl con una jeringa 30 G en el interior de un conducto simulado en un bloque de resina acrílica previamente instrumentado y el irrigante era renovado (1 ml de la solución) después de cada ciclo de activación.

En nuestro caso el flujo constante controlado de 1 ml/min se estableció con una bomba de dispensación porque se ha visto que este parámetro varía mucho entre los operadores, siendo difícil su control y estandarización (124). No hay consenso en cuanto al volumen de las soluciones en la bibliografía; según los tiempos establecidos se estimó un volumen total para los grupos de soluciones dispensadas de NaOCl y agua destilada de 10 ml y para los grupos donde se dispensaban el NaOCl y quelante, de 15 ml.

Además, no se introdujeron surfactantes ni se activaron los irrigantes ya que se pretendía analizar el comportamiento pasivo de los irrigantes dispensados bajo un flujo controlado para asegurarnos su renovación, en comparación con los estudios previos que como se ha mencionado anteriormente sumergían el tejido en las soluciones. Consideramos que uno de los aspectos más importantes en la fase de irrigación es la renovación constante con una gran cantidad de volumen del irrigante y hasta ahora la

mayoría de los estudios de disolución de tejido no tenían en cuenta este parámetro. Tampoco se introdujeron las muestras de tejido en ningún sustrato para no añadir más variables que pudieran afectar a la capacidad de disolución de las soluciones a testar. Se observó el efecto de las soluciones sobre el tejido de forma directa colocándolo sobre un filtro que dejara pasar la solución (pero no el tejido) evitando así sumergir las muestras en las soluciones y favoreciendo el flujo continuo, controlado y renovado de las mismas.

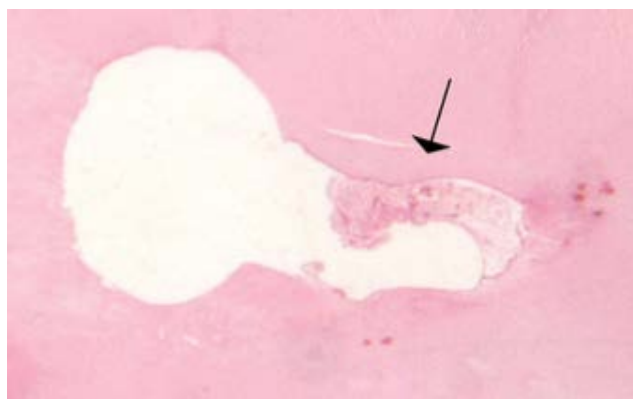
La disolución del tejido difiere cuando entra en contacto directo con el irrigante a cuando está localizado en el interior del conducto radicular. Por eso hay que aumentar el tiempo de irrigación o la renovación del irrigante aplicando un mayor volumen de este después de la conformación definitiva puesto que se ha visto que un conducto de una longitud de 18 mm y una preparación apical de 35 y conicidad del 6% permite en su interior sólo un volumen de 0,0126 ml de irrigante dispensado con presión positiva con jeringa (210).

#### **8.1.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DISOLUCIÓN Y DEL CLORO LIBRE.**

Para **cuantificar la capacidad de disolución** de una solución se han empleado diferentes metodologías. Las más comunes son: cuantificación del tiempo (53, 61, 67, 77, 95) (**Figura 29**) o velocidad de disolución completa (mg/s o mg/min) (23, 58, 61), disolución parcial calculando la pérdida de peso del tejido o peso remanente en un tiempo determinado con balanza de precisión (24, 39, 48, 54, 57, 59, 72, 73, 75, 78, 79, 84, 90, 93), medición de la distancia en mm hasta el tejido que queda sin disolver (ya sea visualmente por ejemplo en conductos laterales en un modelo de resina epóxica transparente) (63, 64, 69) (**Figura 26**), o mediante fotografías en un modelo de diente transparentizado (70), análisis indirecto de la solución (cantidad de fosfato e hidroxiprolina o cloro libre) (45, 54, 56, 92) o mediante análisis histológico calculando el porcentaje de tejido remanente en la sección transversal de dientes extraídos vitales (44, 46, 50) (**Figura 30**).



**Fig.29.** Tejido pulpar humano con barra de dentina sumergido en solución de  $\text{NaOCl}$  tomado de Cullen y cols, 2015 (53).



**Fig.30.** Presencia de tejido pulpar en conductos ovaes donde se ha realizado la preparación químico-mecánica tomado de De-Deus y cols, 2013 (50).

El inconveniente de medir la disolución completa del tejido es la dificultad que supone determinar el punto final exacto visualmente (incluso con magnificación) debido al gran número de burbujas que surgen resultado de la saponificación (79); por eso, al emplear esta metodología hay que agitar la solución para evitar la formación de burbujas, poniendo de fondo un color que contraste para mejorar la visión y así controlar el momento en que el tejido deja de ser visible. Es por tanto una medición con componentes subjetivos, que depende de la percepción del evaluador.

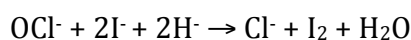
Asimismo, los métodos indirectos de detección de hidroxiprolina o fosfato en soluciones de NaOCl, también presentan inconvenientes. La identificación de hidroxiprolina equivaldría a una medida indirecta de la presencia de colágeno, y con ello de pulpa (ya que esta consta de un 15% de colágeno, el cual contiene aproximadamente un 13% de hidroxiprolina) (45); sin embargo, el ensayo bioquímico utilizado para su detección no es muy fiable cuando se emplea NaOCl porque descompone la hidroxiprolina distorsionando los resultados (54). Por otro lado, la detección de fosfato en el extracto puede no reflejar la disolución de todo el tejido ya que los quelantes liberan mayor cantidad de fosfato porque tienen mayor afinidad por el componente inorgánico de la pulpa (54). Por ello no hubieran sido métodos fiables ya que las soluciones que empleamos de NaOCl y quelantes pueden alterar la determinación bioquímica.

En esta tesis doctoral se eligió la pérdida de peso del tejido durante la exposición a las diferentes soluciones a los 2, 5 y 10 minutos calculándose el peso inicial y final en cada uno de los tiempos en una balanza de precisión hermética. A continuación, se calculó el porcentaje de tejido remanente en cada uno de los tiempos fijados siendo el método más empleado en la bibliografía consultada (24, 39, 65, 73, 83, 84, 87, 90, 203). Otros autores han empleado la misma metodología, pero mientras unos desecan las muestras de tejido antes de pesarlas con un desecador o con una bomba de vacío (47, 78) o centrifugando para eliminar el exceso de fluido y luego las rehidratan para someterlas a las soluciones (57); otros, como en nuestro caso, las secan de la misma forma con papel filtro absorbente antes de pesarlas y no se rehidratan de nuevo para no aumentar el peso posterior por retención de líquido (39, 83, 203).

Se han establecido estos tiempos (2, 5 y 10 minutos) porque se observó en el grupo control positivo que el 6% NaOCl mostraba una disolución completa a los 5 minutos al dispensarla con un flujo constante de 1ml/min. Y se consideró que la mitad de la concentración, podría necesitar el doble de tiempo. En cambio, Tartari y cols (39) establecieron 5, 10 y 15 minutos; sin embargo, ellos no refrescaban las soluciones y las mezclaban por lo que interaccionaban antes de sumergirse el tejido en ellas. Por ambos motivos no observaban disolución completa a pesar de mantenerlas durante más tiempo.

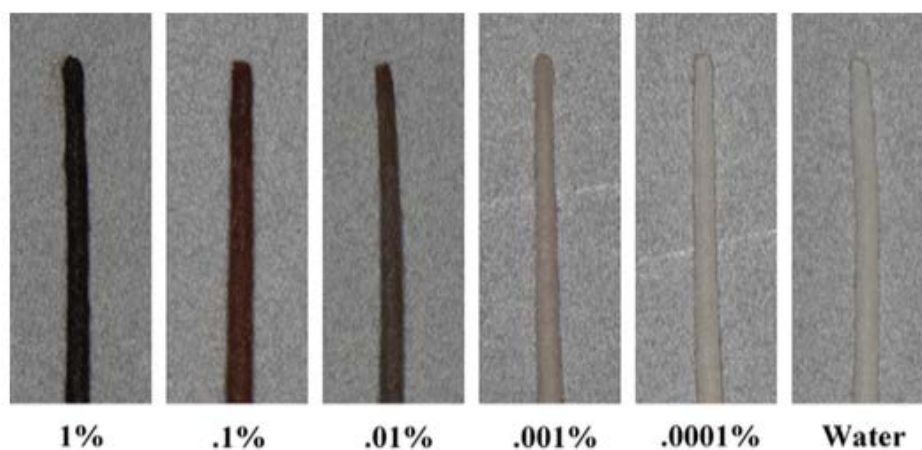
Por otro lado, en nuestro estudio además se determinó **el contenido de cloro libre** de las soluciones iniciales y resultantes. Para ello se utilizó la valoración yodométrica (201) empleada en los estudios de Arias-Moliz y cols (179, 181). Otros autores como Estévez y cols (90) utilizaron también la valoración yodométrica, pero de la *British Pharmacopoeia*. Sin embargo, otros estudios (79, 81, 91) no controlaron el cloro libre de las soluciones de NaOCl. El procedimiento de la valoración yodométrica incluye subproductos como el ión clorato que no tiene propiedades terapéuticas, pero puede interferir en la lectura del cloro libre obteniendo una sobreestimación. Esto hace que este método sea quizá menos fiable que métodos más complejos como la cromatografía de líquidos o la espectrometría de masas (211).

Rechenberg y cols (212) desarrollaron un método para cuantificar el cloro libre en pequeños volúmenes como es el conducto radicular (1-3 mm<sup>3</sup>, donde entran de 1-3 µl de solución) usando puntas de papel impregnadas en yoduro potásico. Se basa en la reacción redox que se produce entre el ión hipoclorito y el yoduro potásico, que son incoloros, dando lugar al yodo (I<sub>2</sub>), el cual es marrón, existiendo una correlación entre el color de la punta de papel y la concentración del NaOCl (**Figura 31**).



Con este método se podría valorar la dinámica de consumo del cloro libre en el interior del conducto ya que tanto el tejido pulpar, la dentina y las bacterias lo consumen. Nos ayudaría a conocer la duración del efecto biológico de las soluciones para saber cuando es necesaria su renovación (212). La diferencia entre los dos métodos es la cantidad de solución que se requiere para determinar la cantidad de cloro libre, en la valoración yodométrica entre 500-1000 µl y en el de Rechenberg y cols (212), entre 1-3 µl. Sin embargo, cuenta con la limitación de que solo determina concentraciones de NaOCl entre 0,0001%-1%.

En el estudio de Ragnarsson y cols (213) observaron con estas puntas impregnadas en 15% de yoduro de potasio, que el NaOCl colocado pasivamente en el interior del conducto se mantiene activo durante tiempo prolongado (100 minutos), aunque dependiente de su concentración.



**Fig.31.** Correlación entre el color de la punta de papel y la concentración de NaOCl tomado de Rechenberg y cols, 2014 (212).

Parece que son necesarios más estudios que avalen este método. Por eso, hemos utilizado la valoración yodométrica descrita anteriormente porque es la más extendida aunque no está exenta de limitaciones.

## **8.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.**

Debido a la metodología novedosa de esta tesis doctoral en la que se emplea por primera vez el flujo continuo alternante del NaOCl con un agente quelante sin premezclar para analizar la capacidad de disolución, es difícil comparar los resultados obtenidos respecto a los de los estudios previos.

Para discutir los resultados se ha dividido esta sección en 2 apartados: por un lado se discutirán los resultados respecto a la variable dependiente principal analizada en este estudio (tejido pulpar remanente) y por otro, se contemplarán aquellas otras variables producto de la interacción de irrigantes que podrían influir en la capacidad de disolución del tejido (contenido de cloro libre, pH, temperatura y formación de precipitado).

### **8.2.1. PÉRDIDA DE PESO O PORCENTAJE DE TEJIDO REMANENTE.**

Teniendo en cuenta los estudios en los que se empleó el NaOCl de forma aislada o combinada con los quelantes podemos ver que los resultados son muy dispares.

#### **a. Soluciones aisladas: NaOCl y agua destilada.**

En esta tesis doctoral, el 6% NaOCl tardó solamente 5 minutos en disolver completamente todo el tejido, mientras que el 3% NaOCl, osea a mitad de concentración, 10 minutos. Este tiempo de disolución se prolonga en los estudios (23, 26, 53, 54, 57, 58, 60, 62, 83, 86, 93) en los que se emplea una concentración menor de NaOCl, una mayor proporción de tejido/solución o en los que se sumerge el tejido en la solución sin renovarse la solución a estudiar. Con un flujo continuo de la solución de NaOCl como hemos visto en nuestro estudio se obtiene una mayor eficacia en la capacidad de disolución disminuyéndose así el tiempo de disolución completa.

En cuanto a la concentración del NaOCl, coincidimos con la mayoría de los autores (25, 52-54, 58, 65, 67, 72, 73, 76, 77, 79, 80, 83, 86, 87, 93, 95, 107) en que a mayor concentración de NaOCl, mayor es la disolución de tejido excepto en los hallazgos de Beltz y cols (59) en los que tanto la concentración del 5,25% como la del 2,6% disolvieron el 90% del tejido pulpar bovino sin diferencias significativas entre las dos concentraciones, probablemente debido al estado del tejido liofilizado y de Taneja y cols (52) que observaron diferencias entre las concentraciones de NaOCl a los 30 minutos,

pero no a los 60 minutos probablemente debido a la inactivación que sufre la solución cuando esta no se renueva.

En el caso de Abou-Rass y cols (95), el tejido fresco de tejido conectivo de rata a temperatura ambiente tardó también 60 minutos en disolverse completamente en 5,25% NaOCl y 169 minutos cuando se empleó 2,6% NaOCl. Sin embargo, Hand y cols (93) al sumergir tejido conectivo necrótico de rata obtuvieron a los 7 minutos el 72% de tejido disuelto con una concentración de NaOCl del 5,25% y del 26%, con el 2,5% NaOCl. En este caso, consiguieron una disolución mayor a pesar de sumergir el tejido porque agitaron de forma automática la solución.

Morgan y cols (57) sumergieron el tejido pulpar bovino en 2,6% NaOCl y se disolvió aproximadamente el 80% de su peso a los 32 minutos, ya que ellos también refrescaban la solución cada 3 minutos y además la agitaban mecánicamente. En cambio, en el estudio de Tanomaru-Filho y cols (75), la misma concentración de NaOCl (2,5%) agitada, pero esta vez sin refrescar disolvió entre 64,5-67% de tejido pulpar bovino en 10 minutos. La proporción de tejido-solución era de 8:1 y 6:1, respectivamente siendo un factor que influye también en la capacidad de disolución en los casos en los que se disuelve tejido sumergiéndolo en una solución. La reducción de tejido en este último estudio fue mayor que en los estudios de Tartari y cols (83), quien tampoco renueva las soluciones, debido principalmente a la procedencia del tejido (tejido pulpar en el primero respecto a tejido muscular bovino en el de Tartari y cols).

Camps y cols (65) no obtuvieron disolución completa del tejido a los 20 minutos cuando emplearon 2,5% NaOCl a pH 12. A los 10 min observaron sólo un 70% de reducción del tejido, siendo del 50% cuando se empleó una solución de NaOCl a la misma concentración, pero neutralizada a un pH 7. En nuestro caso, se obtuvo la disolución completa a los 10 min con una solución del 3% NaOCl no modificada debido al flujo continuo.

Irala y cols (67) observaron que 4 ml de las soluciones de NaOCl de forma aislada a concentraciones 2,5% y 1% disolvían completamente el tejido a los 35 y 76 minutos. Estos tiempos fueron probablemente tan elevados debido al volumen empleado de irrigante y a la falta de renovación del mismo puesto que en nuestro estudio con muestras del mismo tipo de tejido estandarizadas en dimensiones y peso a las que se les

aplicó una irrigación continua y controlada, sin sumergirlas y con una constante renovación del irrigante se obtuvo la disolución completa con una concentración similar del 3% a los 10 minutos.

En el estudio de Cobankara y cols (66) el 5,25% NaOCl disolvió el 28% de tejido pulpar bovino con una media de peso de 25 mg a los 20 minutos al sumergirlo en 2 ml de solución bajo agitación y renovación cada 2 minutos. Ballal y cols (48) tardaron 120 min en conseguir la disolución completa de 26 mg de tejido pulpar humano al sumergirlo en 5 ml de solución 2,5% NaOCl y someterlo a agitación automática sin renovación. Y Okino y cols (23) determinaron que la solución de 2,5% NaOCl presentaba una velocidad de disolución de 0,55 mg/min cuando se sumergía tejido pulpar bovino (29,25 mg) en 20 ml de solución con una agitación de 150 rpm. Todos estos estudios tardaron más en disolver el tejido que en el tiempo que se necesitó en nuestro estudio, en que como se ha mencionado anteriormente, había una renovación constante que hizo que la solución de 3% NaOCl consiguiera la disolución completa del tejido pulpar bovino en 10 minutos.

El tipo de tejido utilizado también influye en los tiempos observados para la disolución de tejidos. Así, Naenni y cols (24) evaluaron el porcentaje de peso de tejido remanente de mucosa palatina que quedaba a lo largo del tiempo (15, 30, 60, 90 y 120 min) cuando se sumergía en 10 ml de 1% NaOCl y tras 15 minutos, aún quedaba el 68% del peso remanente sin obtenerse la disolución completa después de 2 horas. Igualmente, Christensen y cols (87) no consiguieron tampoco la disolución completa a los 30 minutos de sumergir 100 mg de tejido de músculo porcino en 10 ml de NaOCl a diferentes concentraciones (5,25% y 2,6%) y pH (6, 9 y 12) sin renovarlo a pesar de agitarse las soluciones. Sin embargo, Clarkson y cols (76) sí obtuvieron una disolución completa a los 10 minutos con una concentración de NaOCl del 4% ya que utilizaron tejido pulpar, aunque este fuera porcino. Igualmente encontraron disolución completa con una concentración menor del 1% a los 23 minutos independiente de si la solución contenía o no surfactante obteniéndose mejores resultados que Christensen y cols (87) a pesar de emplear una concentración menor de NaOCl debido por un lado a la proporción tejido/solución y por otro al tipo de tejido que a pesar de ser del mismo origen, la localización era diferente (músculo-pulpa).

En nuestro estudio también obtuvimos mejores resultados que Christensen y cols (87) ya que a los 15 minutos ellos observaron únicamente un 24,5% de pérdida de peso con 5,25% NaOCl (pH=12) y con la mitad de concentración e igual pH, un 2% mientras que nosotros observamos la disolución completa del tejido pulpar a los 10 minutos con ambas concentraciones (6 y 3%). Las diferencias encontradas entre nuestro estudio y los de los dos autores anteriores (Naenni y Christensen) se deben principalmente a la falta de renovación de la solución y al tipo de tejido utilizado. Asimismo, el tipo de tejido influyó en que Jungbluth y cols en 2011 (88) obtuvieran solo una pérdida de peso del 45% a pesar de la alta concentración del NaOCl empleado (5%) a los 8 minutos, ya que en su estudio emplearon mucosa palatina porcina.

Así, como decíamos, nuestros resultados no son directamente comparables con la mayoría de los estudios de disolución de tejido publicados porque sumergen el tejido en la solución a estudiar sin renovarse el irrigante. Sin embargo, Cullen y cols en 2015 (53) quienes también sumergieron el tejido pulpar humano en 2 ml de NaOCl a diferentes concentraciones, sí renovaron la solución, aunque lo hicieron cada 6 minutos durante 1 hora. Al renovar ellos cada 6 minutos el NaOCl y nosotros utilizar un flujo continuo con renovación constante sobre tejido pulpar no sumergido, ellos también obtuvieron disolución completa del tejido, pero en el doble de tiempo: después de 9,3 minutos cuando la concentración fue del 6% NaOCl y después de 20 minutos cuando la concentración fue del 2%.

Otro de los factores que afecta a los resultados en los estudios de disolución de tejido es, no solo el tipo, sino también la proporción del mismo con respecto al volumen de la solución que se emplea, aunque se puede compensar con la renovación y la agitación de la solución. Ya en 1981, Gordon y cols (55) estudiaron la variación de la proporción tejido/solución (10, 20 y 50 mg/ml 5% NaOCl) para observar su efecto sobre el porcentaje de tejido disuelto, obteniendo en las dos primeras un 74% de tejido disuelto y en la última, sólo un 60%, debido a la gran cantidad de pulpa con respecto a la solución.

En nuestra tesis doctoral el tejido es irrigado con una solución con flujo constante sin ser sumergido a diferencia de otros estudios, en los que al emplear una proporción de tejido/volumen mayor, el porcentaje de pérdida de peso obtenido es menor o el tiempo de disolución mayor (25, 26, 57, 65, 66, 75). A continuación, vamos a comparar

nuestros resultados con los estudios que emplearon el mismo tipo de tejido que en nuestro trabajo, tejido pulpar bovino. Arslan y cols (26) consiguieron una disolución media del 59,88% (DS=11,44) a los 60 minutos siendo la proporción del tejido empleado de 6,5 mg/ 0,1 ml 5,25% NaOCl sin renovar, sin agitación y colocado el tejido y la solución en un reservorio de dentina. Sin embargo, con las mismas condiciones y también sin renovación ni agitación, Couto de Oliveira y cols (25) consiguieron con la misma proporción de NaOCl el 98% de pérdida de peso en la mitad de tiempo ya que la proporción de tejido/solución fue menor (10 mg/ 5ml). Este porcentaje de pérdida de peso del mismo tejido aumenta aún más en el estudio de Morgan y cols (57) a pesar de emplear la mitad de concentración de NaOCl debido a que emplean una proporción de tejido/solución menor (90 mg/11,25 ml) obteniendo el 80% de pérdida de peso en la mitad de tiempo (32 minutos) que Arslan y cols (26); además, de que renuevan y agitan la solución. Camps y cols (65) obtienen una pérdida de peso del 70% a los 10 minutos con una solución del 2,5% NaOCl agitada y una proporción tejido/solución de 100 mg/1 ml. En cambio, Cobankara y cols (66) obtienen una pérdida de peso aún menor del 28,11% a los 20 minutos a pesar de emplear 5,25% NaOCl renovando la solución cada 2 min y agitándola, con una proporción de 25 mg/2 ml. Como podemos observar, en cualquiera de los estudios citados anteriormente, la pérdida de peso obtenida del tejido pulpar bovino es menor que la obtenida por nosotros debido a que no emplean un flujo de solución constante y el tejido es sumergido en una solución de NaOCl que va inactivando su capacidad de disolución a lo largo del tiempo. En esta tesis doctoral se ha utilizado este modelo con renovación constante ya que se ha tratado de conseguir un mayor acercamiento a una situación clínica real.

Al igual que otros autores, en nuestro estudio se observó un incremento en el peso en el grupo control negativo, en el que se empleaba el agua destilada (23, 24, 39, 55, 79, 93) debido a la absorción de agua presente en las soluciones del tejido, mostrando de nuevo su ineficacia para disolver tejido. Esta ganancia de peso también se ha observado cuando se emplea suero salino como grupo control, siendo en el estudio de Cobankara y cols (66), del 4,90%. En cambio, en el estudio de Cullen y cols (53), en el grupo de suero salino no se produjo ningún cambio en el peso.

En resumen y en cuanto a los resultados obtenidos en el porcentaje de pérdida de peso de tejido con NaOCl de forma aislada hay que valorar los siguientes factores: el tipo

de tejido, la concentración y el pH de las soluciones, la proporción tejido/solución y la dispensación de las soluciones reflejados en la **Tabla 11**. Pero como se puede observar en la tabla, existe una tremenda variabilidad en estos factores entre los diferentes estudios que dificultan la comparación de los resultados.

**Tabla 11.** Resultados de los estudios sobre disolución de tejido en los que emplean soluciones de NaOCl aisladas.

Autores	Tejido sumergido	Solución	Peso/volumen	Tiempo	Pérdida peso
Hand 1978 (93)	Conectivo rata	5,25% NaOCl	74 mg	7 min	72%
		2,5% NaOCl	10 mg/1 ml		26%
Abou-Rass 1981 (95)	Conectivo rata	5,25% NaOCl	No especifica peso/30 ml	60 min	100%
		2,6% NaOCl		169 min	100%
Morgan 1991 (57)	Pulpa bovina	2,6% NaOCl	90 mg/11,25ml	32 min	80%
Naenni 2004 (24)	Mucosa palatina porcina	1% NaOCl	83±9 mg/10ml	15 min	32%
Okino 2004 (23)	Pulpa bovina	2,5% NaOCl	29,25 mg/20 ml	-	0,55 mg/min
Christensen 2008 (87)	Músculo porcino	5,25% NaOCl	40-100 mg/10ml	15 min	24,5%
		2,6% NaOCl			2%
Camps 2009 (65)	Pulpa bovina	2,5% NaOCl	100 mg/1 ml	5 min	40%
		pH=12		10 min	70%
		2,5% NaOCl		5 min	31%
		pH=7		10 min	50%
Stojicic 2010 (79)	Músculo porcino	5,8% NaOCl	68±3 mg/10 ml	5 min	30%
		2% NaOCl			4%
Cobankara 2010 (66)	Pulpa bovina	5,25% NaOCl	25 mg/2 ml	20 min	28%
Ballal 2011 (48)	Pulpa humana	2,5% NaOCl	26 mg/5 ml	120 min	100%
Jungbluth 2011 (88)	Mucosa palatina porcina	5% NaOCl	205 mg /1,5 ml	8 min	45%
Singh 2012 (49)	Pulpa bovina	2% NaOCl	15 mg/5 ml	30 min	30%
Couto Oliveira 2013 (25)	Pulpa bovina	5,25% NaOCl	10 mg/ 5ml	30 min	98%
		2,5% NaOCl			20%
Taneja 2014 (52)	Pulpa humana	5% NaOCl	9 mg/5 ml	30 min	13,54%
		2,5% NaOCl			10,82%
		5% NaOCl		60 min	14,89%
		2,5% NaOCl			14,91%
Cullen 2015 (53)	Pulpa humana	8,25% NaOCl	No especifica peso/2 ml	5,7 min	100%
		6% NaOCl		9,3 min	
		4,125%NaOCl		13,9 min	
		2% NaOCl		20,1 min	
		0,5% NaOCl		32,5 min	
Arslan 2015 (26)	Pulpa bovina	5,25% NaOCl	6,5±5 mg/0,1 ml	60 min	59,88%

Tanomaru 2015 (75)	Pulpa bovina	2,5% NaOCl	25±2 mg/4 ml	10 min	64,5-67%
Tartari 2016 (83)	Músculo bovino	5% NaOCl	55 mg/10 ml	5 min	34%
		2,5% NaOCl			11%
		1% NaOCl			9%
		5% NaOCl			61%
		2,5% NaOCl		29%	
		1% NaOCl		21%	
		5% NaOCl		78%	
		2,5% NaOCl		46%	
		1% NaOCl		35%	

### b. NaOCl combinado con soluciones quelantes.

En cuanto a las propiedades de disolución del NaOCl mezclado con las soluciones quelantes, Irala y cols (67) observaron que cuando se sumerge el tejido en una solución previamente mezclada de diferentes concentraciones de NaOCl (2,5% y 1%) con 17% EDTA sin renovación, el NaOCl pierde su capacidad de disolución porque el EDTA produce una pérdida inmediata y casi completa del cloro libre. Por ello estos autores no observaron disolución completa de tejido. De Almeida y cols (73) mostraron una menor disolución de tejido en los tiempos establecidos (5, 15 y 30 min) cuando mezclaron EDTA con diferentes concentraciones de NaOCl en una proporción 1:1 y para una proporción tejido/solución de 45 mg/2 ml. Observaron que se producía mayor disolución de tejido a los 15 min que a los 5 min pero sin diferencias significativas entre los 15 y 30 min debido a la extinción del cloro libre responsable de la disolución de tejido estando este sumergido y sin renovar la solución obteniendo un 16,12% de disolución de tejido a los 5 min al combinar 2,5% NaOCl con 17% EDTA y al mezclar 5% NaOCl con 17% EDTA, un porcentaje menor de disolución de tejido 14,35%. Si analizamos bien las mezclas utilizadas, la concentración de NaOCl en la solución resultante sería la mitad puesto que se mezclan las soluciones 1:1.

No podemos comparar nuestros resultados con los autores anteriores puesto que en nuestro estudio no se mezcló el NaOCl con el EDTA, sino que a diferencia de ellos el quelante se empleó de forma alternante y se renovó la combinación NaOCl-EDTA con un flujo constante obteniendo mejores resultados de disolución. Pero si se observó en las soluciones recolectadas donde si estaban mezclados el NaOCl y EDTA en una proporción

2:1, la reducción del cloro libre debido a la mezcla, lo que afectaría a la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$ .

Tartari y cols (39) realizaron un estudio para evaluar el efecto del  $\text{NaOCl}$ , EDTA y HEBP (15 ml) de forma aislada y combinada sobre la disolución de tejido muscular bovino (2x2x6 mm, 55mg). Para ello, sumergieron las muestras en las distintas soluciones durante 5, 10 y 15 min sin renovarlas, a una temperatura de 32°C y utilizaron agitación ultrasónica. Medían también la pérdida de peso en cada uno de los tiempos. Los mejores resultados se obtuvieron con el  $\text{NaOCl}$  de forma aislada en todos los tiempos, puesto que su combinación con el HEBP disminuía su capacidad de disolución a los 10 y 15 min aunque en menor proporción que el EDTA ya que la mezcla del  $\text{NaOCl}$  con el EDTA volvía a inactivar la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$ . Sin embargo, la mezcla del 5%  $\text{NaOCl}$  con la sal tetrasódica del EDTA al 10 y 20% (pH=12) disolvió el tejido de forma similar que la solución del 2,5%  $\text{NaOCl}$  de forma aislada. En cambio, la sal trisódica mezclada con  $\text{NaOCl}$  no presentó disolución de tejido en ninguno de los tiempos porque el EDTA trisódico inactivó la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$ , a pesar de que se renovaron las soluciones mezcladas (aunque no de forma continua, sino cada 5 minutos) y las muestras de tejido muscular bovino fueron sumergidas (84). El porcentaje de pérdida de peso del 2,5%  $\text{NaOCl}$  y de la mezcla de 5%  $\text{NaOCl}$ +EDTA $\text{HNa}_3$  (10 y 20%) fue de 12,3%, 17,4% y 12,2% respectivamente a los 5 min. A los 10 minutos de inmersión, de 29%, 35,9% y 27% respectivamente y a los 15 minutos, de 46,8%, 50,4% y 40% respectivamente. Este estudio demostró por primera vez que la interacción del EDTA con el  $\text{NaOCl}$  depende del pH de la solución y de la cantidad de iones de sodio presentes en el EDTA (**Tabla 12**).

La gran diferencia entre esta tesis doctoral y los demás estudios publicados hasta el momento es la dispensación continua y controlada de los irrigantes comparado con la inmersión del tejido a disolver en las distintas soluciones. El gráfico de la disolución es diferente cuando se sumerge el tejido que cuando se dispensa con un flujo constante. Cuando el tejido se sumerge, se observa una disolución rápida en los primeros minutos para luego enlentecerse hasta que se agota la solución (56, 92). En cambio, cuando existe un flujo constante de la solución, la disolución es progresiva a lo largo del tiempo (**Figura 24 en el apartado de Resultados**).

Hay que tener en cuenta las limitaciones de este estudio a la hora de extrapolar los resultados de disolución de tejido a la clínica puesto que el tejido pulpar bovino no se introdujo en ningún sustrato ni se valoró la capacidad de disolución en presencia de dentina como en el estudio de Tejada y cols (203) sino que se produjo el contacto directo del tejido con las soluciones pero, sin sumergirlo. Por eso, los tiempos obtenidos de disolución completa podrían ser diferentes a los clínicos puesto que cuando no hay contacto directo con el irrigante, el tiempo de disolución aumenta y puede no conseguirse la disolución completa (44) aunque en la práctica diaria, también se añadiría el efecto de la instrumentación. Un futuro estudio continuación de esta tesis doctoral pretende explorar estos factores.

**Tabla 12.** Resultados de los estudios sobre disolución de tejido en los que emplean soluciones mezcladas de NaOCl con quelantes (EDTA o HEBP) mezclados.

Autores	Tejido sumergido	Concentración NaOCl	Quelante	Peso/vol	Tiempo	Pérdida peso	
Irala 2010 (67)	Pulpa bovina	1% NaOCl	17% EDTA	no peso/4 ml	48 h	No disuelve	
		2,5% NaOCl					
de Almeida 2015 (73)	Pulpa bovina	2,5% NaOCl	17% EDTA	45 mg/2 ml	5 min	16,12%	
					15 min	33,43%	
					30 min	67,78%	
		5% NaOCl			5 min	14,35%	
					15 min	19,74%	
					30 min	21,48%	
Tartari 2015 (39)	Músculo bovino	2,5% NaOCl	no quelante	55 mg/15 ml	5 min	9%	
					10 min	25%	
					15 min	40%	
		5% NaOCl	18% HEBP		5 min	6%	
					10 min	15%	
					15 min	27%	
Tartari 2017 (84)	Músculo bovino	2,5% NaOCl	no quelante	55 mg/10 ml	5 min	12%	
					10 min	29%	
					15 min	47%	
					17% Na <sub>3</sub> EDTA	5 min	0%
						10 min	0%
						15 min	0%
		5% NaOCl	10% Na <sub>4</sub> EDTA		5 min	17%	
					10 min	36%	
					15 min	50%	
					20% Na <sub>4</sub> EDTA	5 min	12%
						10 min	27%
						15 min	40%

Autores	Tejido sumergido	NaOCl	Quelante	Peso/vol	Tiempo	Pérdida peso	
						Sin dentina	Con dentina
Tejada 2018 (203)	Músculo bovino	2,5%	no quelante	30 mg/1ml	3 min	35,69%(6,34)	5,93%(3,70)
					10 min	66,01%(1,74)	9,28%(1,61)
		5%	18% HEBP		3 min	24,90%(5,79)	7,17%(3,95)
					10 min	53,22%(7,45)	4,69%(3,14)

**8.2.2. OTRAS VARIABLES:** contenido de cloro libre, pH, temperatura y formación de precipitado.

**a. Determinación del contenido de cloro libre.**

Contenido de cloro libre de las soluciones aisladas de NaOCl.

Un factor a tener en cuenta cuando se analiza la capacidad de disolución del **NaOCl** es la cantidad de cloro libre presente en la solución, ya que es la parte responsable de la disolución de tejido, existiendo una relación directa entre esta y el contenido de cloro libre. En algunos estudios (79, 81, 91) este factor no se tiene en cuenta. Conviene reseñar que, a veces, las concentraciones reflejadas por los fabricantes no coinciden con la realidad en cuanto a cloro libre se refiere; por ello es recomendable medirlo al iniciar un estudio sobre capacidad de disolución o sobre los factores que afectan al cloro libre, como, por ejemplo, la presencia de surfactante o la interacción entre otras soluciones.

En el estudio de Clarkson y cols (76) todas las soluciones de NaOCl poseían un porcentaje de cloro libre más alto que el indicado por el fabricante siendo para la solución 4% NaOCl de 4,66 y para 1% NaOCl de 1,56. Nuestros resultados coinciden con los de este estudio: encontramos que las soluciones de NaOCl del 6% y 3% presentaban respectivamente un contenido de cloro libre de 6,4% y 3,6-3,9%, mostrando valores algo superiores a los que indicaba el fabricante. En cambio, en el estudio de Estévez y cols (90) emplearon dos soluciones de NaOCl del 6% con y sin surfactante y la determinación del porcentaje de cloro libre fue algo inferior, del 5,85%. Igualmente, Krishnan y cols (170) encontraron un contenido inicial de cloro libre aún menor (de 4,3%) en una solución que supuestamente indicaba 5,2% NaOCl.

Se ha observado también que a medida que se disuelve el tejido sumergido sin renovar, el cloro libre de las soluciones de  $\text{NaOCl}$  va disminuyendo (65, 86, 111) y depende del pH de la solución ya que Camps y cols (65) observaron que el 2,5%  $\text{NaOCl}$  a pH 12 perdía menos cloro que la misma concentración de  $\text{NaOCl}$  neutralizado a pH 7 durante la disolución de tejido. En cambio, en nuestro estudio las concentraciones iniciales de cloro libre de las soluciones aisladas de  $\text{NaOCl}$  no variaron al disolver el tejido debido a que estas soluciones se dispensaron con un flujo continuo y constante. No fue objeto de nuestra investigación el efecto del pH de las soluciones de  $\text{NaOCl}$  sobre su capacidad de disolución ya que se sólo se empleó un pH alcalino de 12 no pudiendo comparar nuestros resultados con los obtenidos por Camps y cols (65).

#### Efecto de la interacción de los quelantes usados sobre el cloro libre.

También se ha observado que la combinación del  $\text{NaOCl}$  con **EDTA** produce una inactivación del  $\text{NaOCl}$  debido a que se produce una pérdida inmediata del cloro libre de hasta del 80-88% al principio de la mezcla para luego ser más progresiva, incluso con pequeñas cantidades de EDTA afectando a la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$  (36-38, 170, 177). Se ha observado que al mezclar 1%  $\text{NaOCl}$  con 17% EDTA en una proporción 1:1 disminuye el contenido de cloro libre entre 0,06-0,1% (37, 38) y al mezclar una concentración mayor de  $\text{NaOCl}$  del 4% con la misma concentración de EDTA, del 0,3% (38). Además de que cuanto mayor es la cantidad de EDTA en la mezcla con el  $\text{NaOCl}$ , mayor es la reducción del cloro libre quedando claro que el  $\text{NaOCl}$  no puede ser utilizado mezclado con el EDTA en el interior del conducto radicular (38, 170).

Esta pérdida del cloro libre parece depender del tipo de la sal del EDTA y de su concentración (84, 172). Por eso, es muy importante especificar en los estudios sobre capacidad de disolución este aspecto. Tartari y cols (84) observaron que la mezcla del 5%  $\text{NaOCl}$  con la sal tetrasódica del EDTA a diferentes concentraciones (10 y 20%) causaba una reducción lenta y progresiva del contenido de cloro libre a lo largo del tiempo (inmediato a la mezcla, 10 min, 30 min, 1 h y 1 día después) a diferencia de con la sal trisódica al 17%, que provocó una pérdida del cloro libre inmediata y rápida en el momento de la mezcla. Esto indica que la interacción entre el  $\text{NaOCl}$  y EDTA depende del pH de la solución, ya que la sal tetrasódica del EDTA presenta un pH más alcalino y de la cantidad de iones sodio presentes en la sal del EDTA. En cambio, los resultados de Krishnan y cols (170) en el mismo año fueron contradictorios al no existir diferencias

significativas entre mezclar EDTA (no especifica el tipo de sal) y SmearOff (solución de sal tetrasódica del EDTA con CHX con pH=8-9) con NaOCl al 5,2% recomendando no usarlos mezclados por reducir drásticamente el cloro libre del NaOCl. Este hecho puede ser debido a que el NaOCl puede reaccionar con otros productos que contiene el SmearOff (Vista Dental) como la CHX y el bisulfito de sodio. Además de diferir de la concentración del EDTA (10%, 17% y 20%) y del pH (8 y 12). El pH del SmearOff era entre 8-9 más cercano al que suele presentar la sal trisódica y el pH de la sal tetrasódica empleada en el estudio de Tartari y cols (84) era de 12 para la concentración del 10% y del 12,2 para la del 20%.

Sin embargo, este efecto no ocurre cuando se combina con el **HEBP**, manteniendo las propiedades del NaOCl debido a que la pérdida de cloro libre es pequeña en los primeros 60 min (36, 177, 179). En el estudio de Arias-Moliz y cols (179) sobre la actividad antimicrobiana de la mezcla 2,5% NaOCl y 9% HEBP, el contenido de cloro libre de la mezcla se mantuvo constante después de 10 minutos; a los 60 minutos fue de 2,41 y a los 120 minutos de 1,77, manteniéndose estable durante una hora. Girard y cols (177) al mezclar 18% HEBP en gel en una proporción 1:10 con 1% NaOCl observaron una pérdida del 10% del cloro inicial a la hora. En el estudio de Biel y cols (172), la reducción del cloro libre fue mayor oscilando entre un 10 y un 30%, dependiendo de la concentración del NaOCl (1 y 5%) y del HEBP (9 y 18%). Cuanto menor es la concentración del HEBP de la mezcla, ligeramente mayor se mantiene la cantidad de cloro libre sin afectar tanto a la concentración del NaOCl. Zollinger y cols (178) observaron que la concentración inicial del NaOCl y la temperatura afecta a la estabilidad del cloro libre. Cuanto mayor era la concentración y la temperatura del NaOCl mezclado con 9% HEBP la pérdida de cloro libre era más acentuada (**Tabla 13**).

En esta tesis doctoral no se ha encontrado que el EDTA y HEBP interfieran en la capacidad de disolución del NaOCl reduciendo el cloro libre ya que en nuestro estudio las soluciones de NaOCl han sido dispensadas bajo un flujo continuo y controlado y los quelantes EDTA y HEBP, de forma alternante (no mezclada). En cambio, en las soluciones mezcladas recolectadas en una proporción de 2:1 se observó una reducción del cloro libre mayor a los obtenidos por otros autores (179) teniendo en cuenta que la cantidad de cloro inicial era del 3,9 y 3,6, siendo mayor de lo que el fabricante marcaba. Realmente los resultados no pueden ser comparados con los obtenidos por otros

estudios puesto que todo el volumen del agente quelante no reacciona a la vez ni con la misma cantidad de NaOCl con nuestra metodología de flujo continuo alternante. En los demás estudios mezclan NaOCl y quelante todo a la vez y van midiendo el cloro libre a lo largo de diferentes periodos de tiempo.

**Tabla 13.** Reducción del contenido de cloro libre en soluciones mezcladas de NaOCl con agente quelante.

Autores	Concentración NaOCl	Quelante	Proporción	Tiempo	Cloro libre
Grawehr 2003 (37)	1% NaOCl	17% EDTA	1:1	Inmediato	0,06%
Clarkson 2011 (38)	1% NaOCl	17% EDTA	1:1	5 min	0,1%
	4% NaOCl				0,3%
Tartari 2017 (84)	5%NaOCl	17% Na <sub>3</sub> EDTA	1:1	Inmediato	16%
		10% Na <sub>4</sub> EDTA			93,5%
		20% Na <sub>4</sub> EDTA			89%
		17% Na <sub>3</sub> EDTA		10 min	11,5%
		10% Na <sub>4</sub> EDTA			90%
		20% Na <sub>4</sub> EDTA			83,5%
Krishnan 2017 (170)	5,2% NaOCl	17%EDTA	90:10	Inmediato	1,47%
			80:20		1,07%
			50:50		0,69%
	5,2% NaOCl	SmearOff (Na <sub>4</sub> EDTA+CHX)	90:10		1,29%
			80:20		1,04%
			50:50		0,53%
Biel 2017 (172)	1% NaOCl	18% Na <sub>4</sub> EDTA	-	1 min	73%
		3% Na <sub>4</sub> EDTA			95%
	5% NaOCl	18% Na <sub>4</sub> EDTA			5%
		3% Na <sub>4</sub> EDTA			96%
	1% NaOCl	18% Na <sub>4</sub> EDTA		10 min	10%
		3% Na <sub>4</sub> EDTA			93%
	5% NaOCl	18% Na <sub>4</sub> EDTA			1%
		3% Na <sub>4</sub> EDTA			5%
Tesis doctoral	3% NaOCl	17% Na <sub>2</sub> EDTA	2:1	10 min	1,7%
Arias-Moliz 2014 (179)	5% NaOCl	18% HEBP	1:1	Inmediato	Estable
				10 min	Estable
Girard 2005 (177)	1% NaOCl	18% HEBP gel	1:10	60 min	90%
Biel 2017 (172)	1% NaOCl	18% HEBP	-	1 min	95%
		9% HEBP			99%
	5% NaOCl	18% HEBP			100%
		9% HEBP			98%
	1% NaOCl	18% HEBP		10 min	92%
		9% HEBP			97%
	5% NaOCl	18% HEBP			100%
		9% HEBP			98%

Zollinger 2018 (178)	1% NaOCl	9% HEBP	-	60 min	Estable
	2,5% NaOCl				Estable
	5% NaOCl				74%
Tesis doctoral	3% NaOCl	18% HEBP	2:1	10 min	2,4%
		9% HEBP			2,2%

### b. pH.

En nuestro estudio las soluciones comerciales de NaOCl (3% y 6%) empleadas tenían un pH inicial entre 12,8-12,9, respectivamente siendo muy similar independientemente de su concentración. No se observó descenso del pH de las soluciones de NaOCl dispensadas de forma aislada al entrar en contacto con el tejido debido al flujo constante de las soluciones coincidiendo con otros autores (65, 86). El pH parece no afectarse y se mantiene estable independientemente de que los estudios se realicen sumergiendo tejido en solución de NaOCl no renovada. Sin embargo, Spanó y cols (58) o Jungluth y cols (88) observaron una disminución del pH inicial de las soluciones de NaOCl después de disolver el tejido, según describen debido a la interacción del NaOH con la materia orgánica por la reacción de saponificación y neutralización producida; pero observaron una reducción de pH inversamente proporcional a la concentración, esta reducción fue menor en concentraciones altas de NaOCl debido a la presencia de más iones hidroxilos. Este autor aplicaba un flujo constante sin sumergir el tejido en la solución (58). Estas discrepancias en los resultados con Jungbluth y cols (88) se deben a las diferencias en la metodología empleada, en la que se sumergía el tejido, en su caso mucosa de paladar (205 mg), en 1,5 ml de 5% NaOCl durante 8 minutos sin renovar la solución teniendo, además, una proporción tejido/solución alta y obteniendo una pérdida de disolución de tejido menor en más tiempo. En cambio, observaron que las soluciones estabilizadas con NaOH a la misma concentración, mantenían el pH constante al contactar con el tejido y disolvían mayor cantidad de tejido sumergido. Pero aún así, se puede ver la diferencia de cómo afecta el modo de dispensación de las soluciones; si se refresca o no las soluciones a pesar de someter el tejido/solución a agitación (**Tabla 14**).

**Tabla 14.** Comparación en el porcentaje de pérdida de peso de tejido con el pH inicial y final del  $\text{NaOCl}$ .

		% pérdida peso	pH antes	pH después
Jungbluth 2011	5% $\text{NaOCl}$	44,7% en 8 min	12,5	7,9
	5% $\text{NaOCl}$ ( $\text{NaOH}$ )	63,3% en 8 min	13,4	13,1
Tesis doctoral	6% $\text{NaOCl}$	100% en 5 min	12,89	12,92
	3% $\text{NaOCl}$	100% en 10 min	12,81	12,77

Al ser soluciones alcalinas pH 12, predomina el cloro libre en forma de  $\text{OCl}^-$  siendo las concentraciones mayores más estables y teniendo mayor capacidad de disolución de tejido (3, 87, 88). En nuestro caso, el grupo control positivo,  $\text{NaOCl}$  (6%) disolvió el 100% de tejido en 5 minutos. La mitad de concentración necesitó el doble de tiempo para disolver la misma cantidad de tejido. A pH 12 y 9, se han descrito diferencias significativas entre la capacidad de disolución del 5,25% y 2,6%  $\text{NaOCl}$ , disolviendo más tejido la mayor concentración de  $\text{NaOCl}$ . Pero cuando desciende el pH a 6, no hay diferencias en la pérdida de peso de tejido entre las dos concentraciones (87).

En cambio, en las soluciones recolectadas en las que el  $\text{NaOCl}$  y el  $\text{EDTA}$  estaban mezclados sí se observó un descenso del pH inmediato debido a que el  $\text{EDTA}$  tiene un pH de aproximadamente de 8,5 a diferencia del  $\text{HEBP}$ , que es de 11. Este hecho fue también observado por Irala y cols (67) cuando se mezclaba el  $\text{EDTA}$  con el  $\text{NaOCl}$  a igual volumen pero a las 48 horas de realizar el experimento. En cambio, el pH no varió en las soluciones donde el volumen del  $\text{EDTA}$  era superior al del  $\text{NaOCl}$ . También Biel y cols (172) observaron esta reducción del pH al mezclar altas concentraciones de  $\text{NaOCl}$  (5%) y  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  (18%). En cambio, con concentraciones menores de  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  (3%), la reducción del pH se producía un poco más tarde, a los 10 minutos.

En nuestro estudio cuando se combinó de forma independiente el  $\text{NaOCl}$  y el  $\text{EDTA}$ , el pH final de la mezcla recolectada (pH=9,47) en proporción 2:1 fue menor que el pH inicial del 3%  $\text{NaOCl}$  (pH=12,81). En cambio, cuando se combinó de forma independiente el  $\text{NaOCl}$  y  $\text{HEBP}$ , el pH final de la mezcla recolectada (pH entre 12,6-12,7) se mantuvo estable coincidiendo con Biel y cols (172) y Tartari y cols (39). Más tarde, estos mismos autores (84) vieron que el pH de las mezclas de las soluciones  $\text{NaOCl}$  con  $\text{EDTA}$  variaba a lo largo de un día cuando la sal que se emplea es la

tetrasódica del EDTA independientemente de su concentración (10 o 20%). En cambio, con la sal trisódica (17% EDTA), el pH de la mezcla se mantiene estable, pero hay una brusca reducción del cloro libre a diferencia de la sal tetrasódica que es más gradual pero presentando una reducción completa después de 24 horas. Asimismo, Irala y cols (67) observaron que el pH de las soluciones mezcladas NaOCl con EDTA en proporción 1:1 disminuyó a las 48 horas, de 10 a 8, pero no ocurrió esto en las soluciones en las que la proporción de EDTA era mayor que la del NaOCl (1:3), posiblemente debido a la reducción de los iones negativos disponibles del NaOCl. Esta diferencia en el comportamiento de los dos quelantes estudiados es debida a que el EDTA (pH=8,57) es un ácido fuerte y en cambio, el HEBP es débil (pH aproximadamente de 11) habiendo diferencia en sus pH iniciales, siendo el de HEPB más próximo al de NaOCl por lo que el HEBP no afectó prácticamente al pH del NaOCl.

### **c. Temperatura y presencia de precipitado.**

Coincidiendo con otros autores (38, 168, 171, 172) en esta tesis doctoral se observó una reacción exotérmica y la formación de burbujas debido a la formación de cloro gas en la solución recolectada donde NaOCl y EDTA se habían mezclado. Este aumento de la temperatura ha sido ya anteriormente descrito por Biel y cols (172) quienes lo observaron al minuto de mezclar NaOCl y Na<sub>4</sub>EDTA a altas concentraciones de (5% y 18% respectivamente); sin embargo, al mezclar 5% NaOCl con una concentración menor del Na<sub>4</sub>EDTA (3%), el aumento de temperatura se produjo más tarde, a los 10 minutos de la mezcla, siendo superior y alcanzando casi los 50°C. En contra, en aquellos grupos en que se mezclaban las diferentes concentraciones de Na<sub>4</sub>EDTA con 1% NaOCl no se observó aumento de temperatura. Prado y cols (168) detectaron la presencia de burbujas con concentraciones de NaOCl igual o superior a 1% mezcladas con 17% EDTA. En soluciones mezcladas de 0,16% NaOCl con 17% EDTA este hecho no fue observado.

En cambio, no se ha observado en esta tesis doctoral ninguna reacción exotérmica ni formación de burbujas al mezclar el NaOCl con el HEBP, coincidiendo con otros autores (172). Además, y a diferencia de Prado y cols (168), también se ha observado la presencia de un precipitado de la sal al mezclar el NaOCl con el EDTA, no en la solución recolectada sino en el filtro donde se colocaba el tejido a disolver.

Futuros estudios son necesarios para evaluar los efectos de esta combinación de irrigantes (NaOCl y quelantes) con flujo continuo alternante sobre la dentina (eliminación de barrillo dentinario, propiedades físico-mecánicas y adhesivas), así como su efectividad antimicrobiana. Además, ya que se ha descrito que la dentina influye de forma negativa en la capacidad de disolución de tejido del NaOCl (73, 203) ya que al poseer alta concentración de carbonatos presenta un efecto buffer sobre la solución y una reducción del cloro libre, pero no renovaron ni refrescaron las soluciones. Sería también interesante conocer el efecto de la presencia de dentina sobre la capacidad de disolución de esta combinación de irrigantes mediante flujo controlado. De hecho, autores que renovaron la solución (aunque cada 6 minutos) no observaron cambios en la capacidad de disolución del NaOCl en presencia de dentina (53, 111).

## **9. CONCLUSIONES**

Teniendo en cuenta las limitaciones de nuestro estudio *in vitro*, en el que se ha utilizado tejido pulpar bovino en contacto directo con las soluciones sin ser sumergido sino sometido a un flujo controlado y teniendo precauciones en la extrapolación de los resultados a la clínica, podemos concluir que:

### **1. En cuanto a la disolución del tejido:**

1.1. La capacidad de disolución de las soluciones aisladas de  $\text{NaOCl}$  depende directamente de su concentración.

1.2. La renovación constante de las soluciones permite una disolución progresiva de tejido a lo largo del tiempo.

1.3. El  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  y el  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  al 18% dispensados bajo un flujo controlado alternante no inactivaron la capacidad de disolución del  $\text{NaOCl}$ .

1.4. El  $\text{Na}_4\text{HEBP}$  al 9% fue el único quelante que redujo la eficacia del  $\text{NaOCl}$  a los 2 y 5 minutos.

1.5. El agua destilada puede ser considerado una solución adecuada como control negativo puesto que no disolvió tejido pulpar bovino a lo largo del tiempo.

### **2. En cuanto al contenido de cloro libre:**

2.1. La disolución del tejido no afectó al contenido del cloro libre de las soluciones de  $\text{NaOCl}$  renovadas constantemente.

2.2. La mezcla del  $\text{NaOCl}$  con cualquiera de los dos quelantes produjo una reducción del cloro libre, siendo más pronunciada con el  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

### **3. En cuanto al pH, temperatura y presencia de precipitado:**

3.1. El pH de las soluciones de  $\text{NaOCl}$  dispensadas de forma aislada no sufrió descenso al estar en contacto con el tejido mediante un flujo constante de las soluciones que permite su renovación continua.

3.2. El  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  al ser mezclado con el  $\text{NaOCl}$  produjo una reducción del pH, una reacción exotérmica con formación de burbujas y un precipitado que pudiera tapizar las paredes dentinarias.

Entendemos que la relevancia clínica de nuestro estudio es que a la vista de los resultados obtenidos parece factible la combinación de NaOCl con un agente quelante, bien sea fuerte o débil, de forma alternante controlando su flujo durante la instrumentación lo que permitiría disolver al mismo tiempo la materia orgánica e inorgánica y así permitir que los detritus producidos durante la conformación de los conductos radiculares no se vayan acumulando en las paredes dentinarias ni en las irregularidades del sistema de conductos. Líneas de investigación futuras son necesarias para esclarecer el efecto de este tipo de combinación sobre la dentina y sobre las bacterias.



## **10. BIBLIOGRAFÍA**



1. Walker A. A definite and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Dent Assoc.* 1936;23(8):1418-25.
2. Grossman LI, Meiman BW. Solution of pulp tissue by chemical agents. *J Am Dent Assoc.* 1941;28(2):223-5.
3. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006;32(5):389-98.
4. Perez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *J Endod.* 2006;32(10):993-7.
5. Peters OA, Laib A, Gohring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod.* 2001;27(1):1-6.
6. Schafer E, Schulz-Bongert U, Tulus G. Comparison of hand stainless steel and nickel titanium rotary instrumentation: a clinical study. *J Endod.* 2004;30(6):432-5.
7. Plotino G, Ahmed HM, Grande NM, Cohen S, Bukiet F. Current assessment of reciprocation in endodontic preparation: A comprehensive review-Part II: Properties and effectiveness. *J Endod.* 2015;41(12):1939-50.
8. Shen Y, Zhou HM, Zheng YF, Peng B, Haapasalo M. Current challenges and concepts of the thermomechanical treatment of nickel-titanium instruments. *J Endod.* 2013;39(2):163-72.
9. Franco V, Fabiani C, Taschieri S, Malentacca A, Bortolin M, Del Fabbro M. Investigation on the shaping ability of nickel-titanium files when used with a reciprocating motion. *J Endod.* 2011;37(10):1398-401.
10. Zhao D, Shen Y, Peng B, Haapasalo M. Root canal preparation of mandibular molars with 3 nickel-titanium rotary instruments: a micro-computed tomographic study. *J Endod.* 2014;40(11):1860-4.
11. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990;16(12):580-8.
12. Paque F, Laib A, Gautschi H, Zehnder M. Hard-tissue debris accumulation analysis by high-resolution computed tomography scans. *J Endod.* 2009;35(7):1044-7.

13. De-Deus G, Marins J, Neves Ade A, Reis C, Fidel S, Versiani MA, et al. Assessing accumulated hard-tissue debris using micro-computed tomography and free software for image processing and analysis. *J Endod.* 2014;40(2):271-6.
14. Paque F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *Int Endod J.* 2011;44(2):148-53.
15. Paque F, Rechenberg DK, Zehnder M. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. *J Endod.* 2012;38(5):692-5.
16. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994;20(6):276-8.
17. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001;34(6):424-8.
18. Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R, Jr. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J.* 2008;34(1):19-24.
19. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod.* 1998;24(7):472-6.
20. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997;23(4):229-31.
21. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J.* 2006;32(3):112-5.
22. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(4):488-92.
23. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J.* 2004;37(1):38-41.
24. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod.* 2004;30(11):785-7.

25. Couto De Oliveira G, Ferraz CS, Andrade Junior CV, Pithon MM. Chlorhexidine gel associated with papain in pulp tissue dissolution. *Restor Dent Endod.* 2013;38(4):210-4.
26. Arslan D, Guneser MB, Kustarci A, Er K, Siso SH. Pulp tissue dissolution capacity of QMix 2in1 irrigation solution. *Eur J Dent.* 2015;9(3):423-7.
27. Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod.* 2007;33(8):966-9.
28. Basrani BR, Manek S, Fillery E. Using diazotization to characterize the effect of heat or sodium hypochlorite on 2.0% chlorhexidine. *J Endod.* 2009;35(9):1296-9.
29. Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RN. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *J Endod.* 2010;36(2):312-4.
30. Thomas JE, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod.* 2010;36(2):315-7.
31. Krishnamurthy S, Sudhakaran S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod.* 2010;36(7):1154-7.
32. Kolosowski KP, Sodhi RN, Kishen A, Basrani BR. Qualitative analysis of precipitate formation on the surface and in the tubules of dentin irrigated with sodium hypochlorite and a final rinse of chlorhexidine or QMiX. *J Endod.* 2014;40(12):2036-40.
33. Arslan H, Uygun AD, Keskin A, Karatas E, Seckin F, Yildirim A. Evaluation of orange-brown precipitate formed in root canals after irrigation with chlorhexidine and QMix and spectroscopic analysis of precipitates produced by a mixture of chlorhexidine/NaOCl and QMix/NaOCl. *Int Endod J.* 2015;48(12):1199-203.
34. Orhan EO, Irmak O, Hur D, Yaman BC, Karabucak B. Does para-chloroaniline really form after mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine? *J Endod.* 2016;42(3):455-9.
35. Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. *J Endod.* 1983;9(4):137-42.
36. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod.* 2005;31(11):817-20.

37. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J.* 2003;36(6):411-7.
38. Clarkson RM, Podlich HM, Moule AJ. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on the active chlorine content of sodium hypochlorite solutions when mixed in various proportions. *J Endod.* 2011;37(4):538-43.
39. Tartari T, Guimaraes BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA, Bramante CM. Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *Int Endod J.* 2015;48(4):399-404.
40. Uzunoglu E, Aktemur S, Uyanik MO, Durmaz V, Nagas E. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid on root fracture with respect to concentration at different time exposures. *J Endod.* 2012;38(8):1110-3.
41. Ulusoy OI, Zeyrek S, Celik B. Evaluation of smear layer removal and marginal adaptation of root canal sealer after final irrigation using ethylenediaminetetraacetic, peracetic, and etidronic acids with different concentrations. *Microsc Res Tech.* 2017;80(7):687-92.
42. Hargreaves KM, Berman LH. Cohen. *Vías de la pulpa.* 11<sup>a</sup> ed 2016.
43. Salas MM, De la Casa ML, López ME. Contenido orgánico de extractos parcialmente purificados de pulpa dental humana y bovina. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2011;54(2):297-304.
44. Senia ES, Marshall FJ, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971;31(1):96-103.
45. Trepagnier CM, Madden RM, Lazzari EP. Quantitative study of sodium hypochlorite as an in vitro endodontic irrigant. *J Endod.* 1977;3(5):194-6.
46. Rosenfeld EF, James GA, Burch BS. Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. *J Endod.* 1978;4(5):140-6.
47. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod.* 2005;31(9):669-71.
48. Ballal NV, Mala K, Bhat KS. Effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on the dissolution of human pulp tissue - An in vitro study. *Int Endod J.* 2011;44(4):353-6.

49. Singh S, Sinha R, Kar SK, Ather A, Limaye SN. Effect of chlorine dioxide and sodium hypochlorite on the dissolution of human pulp tissue - An in vitro study. *Med J Armed Forces India*. 2012;68(4):356-9.
50. De-Deus G, de Berredo Pinho MA, Reis C, Fidel S, Souza E, Zehnder M. Sodium hypochlorite with reduced surface tension does not improve in situ pulp tissue dissolution. *J Endod*. 2013;39(8):1039-43.
51. Slutzky-Goldberg I, Hanut A, Matalon S, Baev V, Slutzky H. The effect of dentin on the pulp tissue dissolution capacity of sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *J Endod*. 2013;39(8):980-3.
52. Taneja S, Mishra N, Malik S. Comparative evaluation of human pulp tissue dissolution by different concentrations of chlorine dioxide, calcium hypochlorite and sodium hypochlorite: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2014;17(6):541-5.
53. Cullen JK, Wealleans JA, Kirkpatrick TC, Yaccino JM. The effect of 8.25% sodium hypochlorite on dental pulp dissolution and dentin flexural strength and modulus. *J Endod*. 2015;41(6):920-4.
54. Koskinen KP, Stenvall H, Uitto VJ. Dissolution of bovine pulp tissue by endodontic solutions. *Scand J Dent Res*. 1980;88(5):406-11.
55. Gordon TM, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. *J Endod*. 1981;7(10):466-9.
56. Nakamura H, Asai K, Fujita H, Nakazato H, Nishimura Y, Furuse Y, et al. The solvent action of sodium hypochlorite on bovine tendon collagen, bovine pulp, and bovine gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985;60(3):322-6.
57. Morgan RW, Carnes DL, Jr., Montgomery S. The solvent effects of calcium hydroxide irrigating solution on bovine pulp tissue. *J Endod*. 1991;17(4):165-8.
58. 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(3):154-7.
59. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod*. 2003;29(5):334-7.
60. Khademi A, Usefian E, Feizianfard M. Tissue dissolving ability of several endodontic irrigants on bovine pulp tissue. *Iran Endod J*. 2007;2(2):65-8.

61. Rossi-Fedele G, De Figueiredo JA. Use of a bottle warmer to increase 4% sodium hypochlorite tissue dissolution ability on bovine pulp. *Aust Endod J.* 2008;34(1):39-42.
62. Rossi-Fedele G, Steier L, Dogramaci EJ, Canullo L, Steier G, de Figueiredo JA. Bovine pulp tissue dissolution ability of HealOzone(R), Aquatine Alpha Electrolyte(R) and sodium hypochlorite. *Aust Endod J.* 2013;39(2):57-61.
63. Al-Jadaa A, Paque F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. *Int Endod J.* 2009;42(1):59-65.
64. Al-Jadaa A, Paque F, Attin T, Zehnder M. Acoustic hypochlorite activation in simulated curved canals. *J Endod.* 2009;35(10):1408-11.
65. Camps J, Pommel L, Aubut V, Verhille B, Satoshi F, Lascola B, et al. Shelf life, dissolving action, and antibacterial activity of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(2):e66-73.
66. Cobankara FK, Ozkan HB, Terlemez A. Comparison of organic tissue dissolution capacities of sodium hypochlorite and chlorine dioxide. *J Endod.* 2010;36(2):272-4.
67. Irala LE, Grazziotin-Soares R, Salles AA, Munari AZ, Pereira JS. Dissolution of bovine pulp tissue in solutions consisting of varying NaOCl concentrations and combined with EDTA. *Braz Oral Res.* 2010;24(3):271-6.
68. Jungbluth H, Peters C, Peters O, Sener B, Zehnder M. Physicochemical and pulp tissue dissolution properties of some household bleach brands compared with a dental sodium hypochlorite solution. *J Endod.* 2012;38(3):372-5.
69. Malentacca A, Uccioli U, Zangari D, Lajolo C, Fabiani C. Efficacy and safety of various active irrigation devices when used with either positive or negative pressure: an in vitro study. *J Endod.* 2012;38(12):1622-6.
70. Malentacca A, Uccioli U, Mannocci F, Bhuva B, Zangari D, Pulella C, et al. The comparative effectiveness and safety of three activated irrigation techniques in the isthmus area using a transparent tooth model. *Int Endod J.* 2018;51 Suppl 1:e35-e41.
71. Guneser MB, Arslan D, Usumez A. Tissue dissolution ability of sodium hypochlorite activated by photon-initiated photoacoustic streaming technique. *J Endod.* 2015;41(5):729-32.
72. de Almeida LH, Leonardo NG, Gomes AP, Giardino L, Souza EM, Pappen FG. Pulp tissue dissolution capacity of sodium hypochlorite combined with cetrimide and polypropylene glycol. *Braz Dent J.* 2013;24(5):477-81.

73. de Almeida LH, Leonardo NG, Gomes AP, Souza EM, Pappen FG. Influence of EDTA and dentine in tissue dissolution ability of sodium hypochlorite. *Aust Endod J.* 2015;41(1):7-11.
74. Niewierowski RS, Scalzilli LR, Morgental RD, Figueiredo JA, Vier-Pelisser FV, Borba MG, et al. Bovine pulp tissue dissolution ability of irrigants associated or not to ultrasonic agitation. *Braz Dent J.* 2015;26(5):537-40.
75. Tanomaru-Filho M, Silveira BR, Martelo RB, Guerreiro-Tanomaru JM. Influence of concentration and agitation of sodium hypochlorite and peracetic acid solutions on tissue dissolution. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(11):876-9.
76. Clarkson RM, Kidd B, Evans GE, Moule AJ. The effect of surfactant on the dissolution of porcine pulpal tissue by sodium hypochlorite solutions. *J Endod.* 2012;38(9):1257-60.
77. Johnson BR, Remeikis NA. Effective shelf-life of prepared sodium hypochlorite solution. *J Endod.* 1993;19(1):40-3.
78. Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980;49(2):175-7.
79. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod.* 2010;36(9):1558-62.
80. Haapasalo M, Wang Z, Shen Y, Curtis A, Patel P, Khakpour M. Tissue dissolution by a novel multisonic ultracleaning system and sodium hypochlorite. *J Endod.* 2014;40(8):1178-81.
81. Ertugrul IF, Maden M, Orhan EO, Ozkorucuklu SP, Aglarca AV. Rapid tissue dissolution efficiency of electrically-activated sodium hypochlorite on bovine muscle. *Eur J Dent.* 2014;8(4):464-8.
82. Ertugrul IF, Maden M, Orhan EO, Ozkorucuklu SP. The effect of micro-electric current and other activation techniques on dissolution abilities of sodium hypochlorite in bovine tissues. *BMC Oral Health.* 2015;15:161.
83. Tartari T, Bachmann L, Maliza AG, Andrade FB, Duarte MA, Bramante CM. Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(3):291-8.

84. Tartari T, Oda DF, Zancan RF, da Silva TL, de Moraes IG, Duarte MA, et al. Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. *Int Endod J.* 2017;50(1):106-14.
85. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod.* 1988;14(3):125-7.
86. Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(6):756-62.
87. Christensen CE, McNeal SF, Eleazer P. Effect of lowering the pH of sodium hypochlorite on dissolving tissue in vitro. *J Endod.* 2008;34(4):449-52.
88. Jungbluth H, Marending M, De-Deus G, Sener B, Zehnder M. Stabilizing sodium hypochlorite at high pH: effects on soft tissue and dentin. *J Endod.* 2011;37(5):693-6.
89. Conde AJ, Estevez R, Lorono G, Valencia de Pablo O, Rossi-Fedele G, Cisneros R. Effect of sonic and ultrasonic activation on organic tissue dissolution from simulated grooves in root canals using sodium hypochlorite and EDTA. *Int Endod J.* 2017;50(10):976-82.
90. Estevez R, Conde AJ, Valencia de Pablo O, de la Torre F, Rossi-Fedele G, Cisneros R. Effect of passive ultrasonic activation on organic tissue dissolution from simulated grooves in root canals using sodium hypochlorite with or without surfactants and EDTA. *J Endod.* 2017;43(7):1161-5.
91. Pena Lopez A, Conde AJ, Estevez R, Valencia de Pablo O, Rossi-Fedele G, Cisneros R. Sodium hypochlorite and a preparation containing glycocholic acid and surfactants have a synergistic action on organic tissue dissolution in vitro. *J Endod.* 2018;44(5):813-5.
92. Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J.* 1982;15(4):187-96.
93. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *J Endod.* 1978;4(2):60-4.
94. The SD. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1979;47(6):558-61.

95. Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. *J Endod.* 1981;7(8):376-7.
96. Estrela C. *Ciencia Endodóntica: Editorial Médica Panamericana*; 2005. 1032 p.
97. Varise TG, Estrela C, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pecora JD. Detection of organochlorine compounds formed during the contact of sodium hypochlorite with dentin and dental pulp. *Braz Dent J.* 2014;25(2):109-16.
98. Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *Br Med J.* 1915;2(2852):318-20.
99. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008;58(6):329-41.
100. Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J.* 2009;42(4):335-43.
101. Wright PP, Kahler B, Walsh LJ. Alkaline sodium hypochlorite irrigant and its chemical interactions. *Materials (Basel).* 2017;10(10):1147.
102. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.
103. Siqueira JF, Jr., Rocas 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;26(6):331-4.
104. Harrison JW, Hand RE. The effect of dilution and organic matter on the antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 1981;7(3):128-32.
105. Kamburis JJ, Barker TH, Barfield RD, Eleazer PD. Removal of organic debris from bovine dentin shavings. *J Endod.* 2003;29(9):559-61.
106. Gambarini G, De Luca M, Gerosa R. Chemical stability of heated sodium hypochlorite endodontic irrigants. *J Endod.* 1998;24(6):432-4.
107. Dumitriu D, Dobre T. Effects of temperature and hypochlorite concentration on the rate of collagen dissolution. *J Endod.* 2015;41(6):903-6.
108. de Hemptinne F, Slaus G, Vandendael M, Jacquet W, De Moor RJ, Bottenberg P. In vivo intracanal temperature evolution during endodontic treatment after the injection of room temperature or preheated sodium hypochlorite. *J Endod.* 2015;41(7):1112-5.

109. Rossi-Fedele G, Guastalli AR, Dogramaci EJ, Steier L, De Figueiredo JA. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2011;44(9):792-9.
110. Baker RJ. Types and significance of chlorine residuals. *J Am Water Works Assoc* 1959;51(9):1185-90.
111. Macedo RG, Wesselink PR, Zaccheo F, Fanali D, Van Der Sluis LW. Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. *Int Endod J.* 2010;43(12):1108-15.
112. Fair GM, Morris JC, L. CS, Weil I, Burden RP. The behaviour of chlorine as water disinfectant. *J Am Water Works Assoc* 1948;40(10):1051-61.
113. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(2):295-8.
114. Fraiss S, Ng YL, Gulabivala K. Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. *Int Endod J.* 2001;34(3):206-15.
115. Palazzi F, Morra M, Mohammadi Z, Grandini S, Giardino L. Comparison of the surface tension of 5.25% sodium hypochlorite solution with three new sodium hypochlorite-based endodontic irrigants. *Int Endod J.* 2012;45(2):129-35.
116. Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod.* 2006;32(11):1091-3.
117. Guastalli AR, Clarkson RM, Rossi-Fedele G. The Effect of surfactants on the stability of sodium hypochlorite preparations. *J Endod.* 2015;41(8):1344-8.
118. Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod.* 2012;38(7):948-53.
119. Cameron JA. The effect of a fluorocarbon surfactant on the surface tension of the endodontic irrigant, sodium hypochlorite. A preliminary report. *Aust Dent J.* 1986;31(5):364-8.
120. Clarkson RM, Moule AJ, Podlich H, Kellaway R, Macfarlane R, Lewis D, et al. Dissolution of porcine incisor pulps in sodium hypochlorite solutions of varying compositions and concentrations. *Aust Dent J.* 2006;51(3):245-51.
121. van der Waal SV, van Dusseldorp NE, de Soet JJ. An evaluation of the accuracy of labeling of percent sodium hypochlorite on various commercial and professional

sources: is sodium hypochlorite from these sources equally suitable for endodontic irrigation? *J Endod.* 2014;40(12):2049-52.

122. Piskin B, Turkun M. Stability of various sodium hypochlorite solutions. *J Endod.* 1995;21(5):253-5.

123. Pécora JD, Guerisoli DMZ, Da Silva RS, Vansan LP. Shelf life of 5% sodium hypochlorite solutions. *Braz Endod J.* 1997;1997(2):43-5.

124. Boutsoukis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E, Bekiaroglou P. Measurement of pressure and flow rates during irrigation of a root canal ex vivo with three endodontic needles. *Int Endod J.* 2007;40(7):504-13.

125. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N. Effect of EDTA, sonic, and ultrasonic activation on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals: an in vitro study. *J Endod.* 2009;35(6):891-5.

126. Paragliola R, Franco V, Fabiani C, Mazzoni A, Nato F, Tay FR, et al. Final rinse optimization: influence of different agitation protocols. *J Endod.* 2010;36(2):282-5.

127. Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009;35(6):791-804.

128. van der Sluis LW, Vogels MP, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. *J Endod.* 2010;36(4):737-40.

129. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study. *J Endod.* 2010;36(7):1216-21.

130. Kuhn K, Rudolph H, Luthardt RG, Stock K, Diebold R, Hibst R. Er:YAG laser activation of sodium hypochlorite for root canal soft tissue dissolution. *Lasers Surg Med.* 2013;45(5):339-44.

131. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod.* 1975;1(7):238-42.

132. Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endod.* 1984;10(10):477-83.

133. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(6):658-66.

134. Shahravan A, Haghdoost AA, Adl A, Rahimi H, Shadifar F. Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. *J Endod.* 2007;33(2):96-105.
135. Economides N, Liolios E, Kolokuris I, Beltes P. Long-term evaluation of the influence of smear layer removal on the sealing ability of different sealers. *J Endod.* 1999;25(2):123-5.
136. Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J.* 2003;36(12):810-30.
137. Ballal NV, Kandian S, Mala K, Bhat KS, Acharya S. Comparison of the efficacy of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid in smear layer removal from instrumented human root canal: a scanning electron microscopic study. *J Endod.* 2009;35(11):1573-6.
138. Kuah HG, Lui JN, Tseng PS, Chen NN. The effect of EDTA with and without ultrasonics on removal of the smear layer. *J Endod.* 2009;35(3):393-6.
139. Rodig T, Dollmann S, Konietschke F, Drebenstedt S, Hulsmann M. Effectiveness of different irrigant agitation techniques on debris and smear layer removal in curved root canals: a scanning electron microscopy study. *J Endod.* 2010;36(12):1983-7.
140. Cobankara FK, Erdogan H, Hamurcu M. Effects of chelating agents on the mineral content of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(6):e149-54.
141. Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod.* 2008;34(7):850-4.
142. Calvo Perez V, Medina Cardenas ME, Sanchez Planells U. The possible role of pH changes during EDTA demineralization of teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989;68(2):220-2.
143. Ballal NV, Mala K, Bhat KS. Evaluation of decalcifying effect of maleic acid and EDTA on root canal dentin using energy dispersive spectrometer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(2):e78-84.
144. Tartari T, Bachmann L, Zancan RF, Vivian RR, Duarte MAH, Bramante CM. Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. *Int Endod J.* 2018;51 Suppl 1:e42-e54.

145. De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J, Jr., et al. Longitudinal co-site optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. *J Endod.* 2008;34(1):71-5.
146. O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC. A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *J Endod.* 2000;26(12):739-43.
147. Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone.* 1999;25(1):97-106.
148. Saito K, Webb TD, Imamura GM, Goodell GG. Effect of shortened irrigation times with 17% ethylene diamine tetra-acetic acid on smear layer removal after rotary canal instrumentation. *J Endod.* 2008;34(8):1011-4.
149. Crumpton BJ, Goodell GG, McClanahan SB. Effects on smear layer and debris removal with varying volumes of 17% REDTA after rotary instrumentation. *J Endod.* 2005;31(7):536-8.
150. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod.* 2002;28(1):17-9.
151. Mello I, Robazza CR, Antoniazzi JH, Coil J. Influence of different volumes of EDTA for final rinse on smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(5):e40-3.
152. Ashraf H, Asnaashari M, Darmiani S, Birang R. Smear layer removal in the apical third of root canals by two chelating agents and laser: A comparative in vitro study. *Iran Endod J.* 2014;9(3):210-4.
153. Yadav HK, Yadav RK, Chandra A, Tikku AP. A scanning electron microscopic evaluation of the effectiveness of etidronic acid, SmearClear and MTAD in removing the intracanal smear layer. *J Dent (Shiraz).* 2017;18(2):118-26.
154. Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. *Int Endod J.* 2005;38(5):285-90.
155. Ballal NV, Mala K, Bhat KS. Evaluation of the effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on the microhardness and surface roughness of human root canal dentin. *J Endod.* 2010;36(8):1385-8.
156. Nygaard-Ostby B. Chelation in root canal therapy: ethylenediaminetetraacetic acid for cleaning and widening of root canals. *Odontologisk Tidskrift.* 1957;65:3-11.

157. Baldasso FER, Roletto L, Silva VDD, Morgental RD, Kopper PMP. Effect of final irrigation protocols on microhardness reduction and erosion of root canal dentin. *Braz Oral Res.* 2017;31:e40.
158. Paque F, Luder HU, Sener B, Zehnder M. Tubular sclerosis rather than the smear layer impedes dye penetration into the dentine of endodontically instrumented root canals. *Int Endod J.* 2006;39(1):18-25.
159. Tartari T, Duarte Junior AP, Silva Junior JO, Klautau EB, Silva ESJMH, Silva ESJPA. Etidronate from medicine to endodontics: effects of different irrigation regimes on root dentin roughness. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(5):409-15.
160. Tasman F, Cehreli ZC, Ogan C, Etikan I. Surface tension of root canal irrigants. *J Endod.* 2000;26(10):586-7.
161. Zehnder M, Schicht O, Sener B, Schmidlin P. Reducing surface tension in endodontic chelator solutions has no effect on their ability to remove calcium from instrumented root canals. *J Endod.* 2005;31(8):590-2.
162. Daghestani M, Alhammadi A, Merdad K, Ohlin J, Erhardt F, Ahlquist M. Comparison between high concentration EDTA (24%) and low concentration EDTA (3%) with surfactant upon removal of smear layer after rotary instrumentation: a SEM study. *Swed Dent J.* 2011;35(1):9-15.
163. Aslantas EE, Buzoglu HD, Altundasar E, Serper A. Effect of EDTA, sodium hypochlorite, and chlorhexidine gluconate with or without surface modifiers on dentin microhardness. *J Endod.* 2014;40(6):876-9.
164. Lui JN, Kuah HG, Chen NN. Effect of EDTA with and without surfactants or ultrasonics on removal of smear layer. *J Endod.* 2007;33(4):472-5.
165. Caron G, Nham K, Bronnec F, Machtou P. Effectiveness of different final irrigant activation protocols on smear layer removal in curved canals. *J Endod.* 2010;36(8):1361-6.
166. Martins Justo A, Abreu da Rosa R, Santini MF, Cardoso Ferreira MB, Pereira JR, Hungaro Duarte MA, et al. Effectiveness of final irrigant protocols for debris removal from simulated canal irregularities. *J Endod.* 2014;40(12):2009-14.
167. Neelakantan P, Varughese AA, Sharma S, Subbarao CV, Zehnder M, De-Deus G. Continuous chelation irrigation improves the adhesion of epoxy resin-based root canal sealer to root dentine. *Int Endod J.* 2012;45(12):1097-102.

168. Prado M, Santos Junior HM, Rezende CM, Pinto AC, Faria RB, Simao RA, et al. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *J Endod.* 2013;39(4):505-10.
169. Baumgartner JC, Brown CM, Mader CL, Peters DD, Shulman JD. A scanning electron microscopic evaluation of root canal debridement using saline, sodium hypochlorite, and citric acid. *J Endod.* 1984;10(11):525-31.
170. Krishnan U, Saji S, Clarkson R, Laloo R, Moule AJ. Free Active Chlorine in Sodium Hypochlorite Solutions Admixed with Octenidine, SmearOFF, Chlorhexidine, and EDTA. *J Endod.* 2017;43(8):1354-9.
171. Baumgartner JC, Ibay AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod.* 1987;13(2):47-51.
172. Biel P, Mohn D, Attin T, Zehnder M. Interactions between the Tetrasodium Salts of EDTA and 1-Hydroxyethane 1,1-Diphosphonic Acid with Sodium Hypochlorite Irrigants. *J Endod.* 2017;43(4):657-61.
173. Solana C, Ruiz-Linares M, Baca P, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM. Antibiofilm activity of sodium hypochlorite and alkaline tetrasodium EDTA solutions. *J Endod.* 2017;43(12):2093-6.
174. Saquy PC, Maia Campos G, Sousa Neto MD, Guimaraes LF, Pecora JD. Evaluation of chelating action of EDTA in association with Dakin's solution. *Braz Dent J.* 1994;5(1):65-70.
175. Grande NM, Plotino G, Falanga A, Pomponi M, Somma F. Interaction between EDTA and sodium hypochlorite: a nuclear magnetic resonance analysis. *J Endod.* 2006;32(5):460-4.
176. Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod.* 2012;38(4):426-31.
177. Girard S, Paque F, Badertscher M, Sener B, Zehnder M. Assessment of a gel-type chelating preparation containing 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate. *Int Endod J.* 2005;38(11):810-6.
178. Zollinger A, Mohn D, Zeltner M, Zehnder M. Short-term storage stability of NaOCl solutions when combined with Dual Rinse HEDP. *Int Endod J.* 2018;51(6):691-6.

179. Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. *J Endod.* 2014;40(12):1999-2002.
180. Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Garcia Garcia E, Hungaro Duarte MA, et al. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J.* 2015;48(12):1188-93.
181. Arias-Moliz MT, Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Baca P. Effects of dentin debris on the antimicrobial properties of sodium hypochlorite and etidronic acid. *J Endod.* 2016;42(5):771-5.
182. Neelakantan P, Cheng CQ, Mohanraj R, Sriraman P, Subbarao C, Sharma S. Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er:YAG laser in vitro. *Int Endod J.* 2015;48(6):602-10.
183. Whitbeck ER, Swenson K, Tordik PA, Kondor SA, Webb TD, Sun J. Effect of EDTA preparations on rotary root canal instrumentation. *J Endod.* 2015;41(1):92-6.
184. Silva e Souza PA, das Dores RS, Tartari T, Pinheiro TP, Tuji FM, Silva e Souza MH, Jr. Effects of sodium hypochlorite associated with EDTA and etidronate on apical root transportation. *Int Endod J.* 2014;47(1):20-5.
185. Ahmed S, Ismail PMS, Sekhar MC, Reddy SNL, Krishna MG, Reddy UN, et al. Evaluation of effect of irrigants with or without surfactant on root canal transportation by cone beam computed tomography - An in vitro study. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(9):ZC75-ZC8.
186. Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod.* 2004;30(8):559-67.
187. Hartmann MS, Barletta FB, Camargo Fontanella VR, Vanni JR. Canal transportation after root canal instrumentation: a comparative study with computed tomography. *J Endod.* 2007;33(8):962-5.
188. Bramante CM, Betti LV. Comparative analysis of curved root canal preparation using nickel-titanium instruments with or without EDTA. *J Endod.* 2000;26(5):278-80.
189. Yadav HK, Tikku AP, Chandra A, Yadav RK, Patel DK. Efficacy of etidronic acid, BioPure MTAD and SmearClear in removing calcium ions from the root canal: An in vitro study. *Eur J Dent.* 2015;9(4):523-8.

190. Saleh AA, Ettman WM. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. *J Dent.* 1999;27(1):43-6.
191. Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *J Endod.* 2004;30(11):792-5.
192. Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Savioli RN, Silva RG, Vansan LP, Pecora JD. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. *J Endod.* 2011;37(3):358-62.
193. Saha SG, Sharma V, Bharadwaj A, Shrivastava P, Saha MK, Dubey S, et al. Effectiveness of Various Endodontic Irrigants on the Micro-Hardness of the Root Canal Dentin: An in vitro Study. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(4):ZC01-ZC4.
194. De-Deus G, Paciornik S, Mauricio MH. Evaluation of the effect of EDTA, EDTAC and citric acid on the microhardness of root dentine. *Int Endod J.* 2006;39(5):401-7.
195. Sayin TC, Serper A, Cehreli ZC, Otlu HG. The effect of EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl with and without subsequent NaOCl treatment on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(3):418-24.
196. Dineshkumar MK, Vinothkumar TS, Arathi G, Shanthisree P, Kandaswamy D. Effect of ethylene diamine tetra-acetic acid, MTAD, and HEBP as a final rinse on the microhardness of root dentin. *J Conserv Dent.* 2012;15(2):170-3.
197. Verma D, Taneja S, Kumari M. Efficacy of different irrigation regimes on the push-out bond strength of various resin-based sealers at different root levels: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2018;21(2):125-9.
198. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Arathi G, Roohi R, Anand S. Effects of various final irrigants on the shear bond strength of resin-based sealer to dentin. *J Conserv Dent.* 2011;14(1):40-2.
199. Tuncel B, Nagas E, Cehreli Z, Uyanik O, Vallittu P, Lassila L. Effect of endodontic chelating solutions on the bond strength of endodontic sealers. *Braz Oral Res.* 2015;29.
200. De-Deus G, Namen F, Galan J, Jr., Zehnder M. Soft chelating irrigation protocol optimizes bonding quality of Resilon/Epiphany root fillings. *J Endod.* 2008;34(6):703-5.
201. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington D.C: APHA; 1989.

202. Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(5):608-13.
203. Tejada S, Baca P, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT. Influence of dentine debris and organic tissue on the properties of sodium hypochlorite solutions. *Int Endod J.* 2018; epub ahead of print.
204. Teruel Jde D, Alcolea A, Hernandez A, Ruiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol.* 2015;60(5):768-75.
205. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod.* 2007;33(4):422-6.
206. Costa BM, Iwamoto AS, Puppim-Rontani RM, Pascon FM. Comparative analysis of root dentin morphology and structure of human versus bovine primary teeth. *Microsc Microanal.* 2015;21(3):689-94.
207. Melo TA, Grundling GS, Montagner F, Scarparo RK, Figueiredo JA, Vier-Pelisser FV. Are bovine teeth a suitable substitute for human teeth in in vitro studies to assess endotoxin load in root canals? *Braz Oral Res.* 2015;29.
208. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci.* 2011;53(3):273-82.
209. Marending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J.* 2007;40(10):786-93.
210. Cohenca N. *Disinfection of root canal systems: The treatment of apical periodontitis.* 1st ed. Wiley-Blackwell. 2014. 376 p.
211. Pisarenko AN, Stanford BD, Quinones O, Pacey GE, Gordon G, Snyder SA. Rapid analysis of perchlorate, chlorate and bromate ions in concentrated sodium hypochlorite solutions. *Anal Chim Acta.* 2010;659(1-2):216-23.
212. Rechenberg DK, Ragnarsson KT, Rueger S, Held L, Mohn D, Zehnder M. A new method to assess available chlorine in small volumes of liquid. *J Endod.* 2014;40(4):534-7.

213. Ragnarsson KT, Rechenberg DK, Attin T, Zehnder M. Available chlorine consumption from NaOCl solutions passively placed in instrumented human root canals. *Int Endod J.* 2015;48(5):435-40.



## **11. ANEXOS**



### 11.1. ANEXO DE ICONOGRAFÍA.

**Fig.1. (A)** Segundo premolar superior con necrosis pulpar periodontitis apical sintomática. **(B)** Control a 3 años de la endodoncia realizada, asintomática y con aparente curación radiográfica.

**Fig.2.** Imágenes de  $\mu\text{CT}$  de un molar inferior tomadas de Zhao y cols, 2014 (10). **(A)** Anatomía interna original de un molar inferior (color rojo). **(B)** Instrumentación del sistema de conductos radiculares del molar inferior con Protaper Next® (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) (color verde). **(C y D)** Superposición de áreas instrumentadas (color verde) y no instrumentadas (color rojo) donde se observa áreas intactas, sobre todo en los conductos distales.

**Fig.3. (A)** Irrigación con hipoclorito de sodio en el interior del conducto mediante jeringa con la aguja doblada a longitud trabajo menos 1 mm. **(B)** Presencia de burbujas en la cámara pulpar debido a la acción del hipoclorito de sodio sobre la materia orgánica.

**Fig.4.** Detritus creados por la lima rotatoria Protaper Next® X2 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) tras conformar el sistema de conductos radiculares.

**Fig.5.** Imágenes de  $\mu\text{CT}$  de raíces mesiales de molares inferiores tomadas de Paque y cols, 2009 (12) y De-Deus y cols, 2014 (13). **(A)** Superposición de la acumulación de restos dentinarios (área gris) al instrumentar raíces mesiales de molares inferiores con el sistema Protaper® Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) sin irrigación sobre la anatomía original de los conductos radiculares (12). **(B)** Presencia de restos dentinarios en el istmo y en áreas instrumentadas. **(C)** Presencia de restos dentinarios después de instrumentar con lima Reciproc® R25 (VDW GMBH, Munich, Germany) con movimiento recíprocante e irrigar de forma convencional con  $\text{NaOCl}$  seguido del quelante EDTA (13).

**Fig.6.** Presencia de precipitado en la pared dentinaria al mezclar el  $\text{NaOCl}$  con CHX. Imagen tomada de Arslan y cols, 2015 (33).

**Fig.7.** Tejido pulpar de un conducto palatino de un segundo molar superior.

**Fig.8.** Composición de la pulpa humana tomada de Hargreaves y cols, 2016 (42).

**Fig.9.** Reacciones químicas en la disolución de tejido pulpar con  $\text{NaOCl}$ . **A)** Saponificación. **B)** Neutralización. **C)** Cloraminación. **D)** Subproductos generados. Imagen tomada de Varise y cols, 2014 (97).

**Fig.10.** Velocidad de disolución de 4%  $\text{NaOCl}$  a diferentes temperaturas (C-20°C, T1-45°C, T2-60°C y T3-75°C). Imagen tomada de Rossi-Fedele y cols, 2008 (61).

**Fig.11.** Representación gráfica de la forma del cloro libre en función del pH del  $\text{NaOCl}$  tomada de Baker, 1959 (110).

**Fig.12.** **(A)** Presencia de *vapor lock* al dispensar el irrigante con presión positiva en dientes transparentizados. **(B)** Penetración del irrigante en los conductos laterales gracias a la activación ultrasónica (125). Fotos cedidas por el Prof. César de Gregorio.

**Fig.13.** Penetración longitudinal del irrigante a lo largo del conducto en diente transparentizado mediante Endovac® (129). Fotos cedidas por el Prof. César de Gregorio.

**Fig.14.** **(A)** Pared dentinaria recubierta por barrillo dentinario después de la instrumentación. **(B)** Eliminación del barrillo dentinario con un agente quelante. Fotos cedidas por Laura Ríus.

**Fig.15.** Eliminación de barrillo dentinario aplicando EDTA y HEBP a la superficie horizontal de un disco de dentina. Imagen tomada de De-Deus y cols, 2008 (145).

**Fig.16.** Quijada bovina con sus dientes anteroinferiores.

**Fig.17.** Obtención del tejido pulpar bovino.

**Fig.18.** Estandarización del tejido pulpar bovino en dimensiones.

**Fig.19.** Distribución de las muestras de tejido pulpar por grupos.

**Fig.20.** **(A)** Bomba de dispensación. **(B)** Muestra de tejido pulpar bovino colocada en un tubo de centrifugación con un filtro interior al que previamente se le había eliminado la membrana porosa que posee para dejar pasar el irrigante. **(C)** Fijación de las agujas al tapón del tubo de plástico donde se recolectan las soluciones dispensadas.

**Fig.21. (D y E)** Medición del peso de tejido remanente en una balanza de precisión inicial y a los 2, 5 y 10 minutos de su exposición a las soluciones, previamente lavados y secados con papel absorbente.

**Fig.22.** Reactivos necesarios para hacer la valoración yodométrica de las soluciones que contienen NaOCl.

**Fig.23.** Valoración del pH y de la temperatura de las soluciones recolectadas.

**Fig.24.** Evolución gráfica de la disolución de tejido de los grupos experimentales.

**Fig.25.** Tejido pulpar bovino estandarizado con punch de biopsia tomado de Cullen y cols, 2015 (53).

**Fig.26.** Molde plástico tomado de Al-Jadaa y cols, 2009 (63,64).

**Fig.27.** Diente transparentizado tomado de Malentacca y cols, 2018 (70).

**Fig.28.** Ranura artificial de 2x2x4 mm realizada con fresa redonda de 2 mm en un diente previamente instrumentado y partido longitudinalmente en dos tomado de Conde y cols, 2017 (89).

**Fig.29.** Tejido pulpar humano con barra de dentina sumergido en solución de NaOCl tomado de Cullen y cols, 2015 (53).

**Fig.30.** Presencia de tejido pulpar en conductos ovals donde se ha realizado la preparación químico-mecánica tomado de De-Deus y cols, 2013 (50).

**Fig.31.** Correlación entre el color de la punta de papel y la concentración de NaOCl tomado de Rechenberg y cols, 2014 (212).

## **11.2. ANEXO DE TABLAS.**

**Tabla 1.** Características del irrigante ideal en endodoncia (2, 3).

**Tabla 2.** Clasificación de las fibras nerviosas de la pulpa (42).

**Tabla 3.** Estudios de disolución de tejido en los que se renueva la solución.

**Tabla 4.** Media y desviación estándar del porcentaje de tejido remanente en los grupos control y experimentales a lo largo del tiempo.

**Tabla 5.** Cloro libre de las diferentes soluciones que contenían NaOCl.

**Tabla 6.** Temperatura final y pH inicial y final de los diferentes grupos.

**Tabla 7.** Tipos de tejido para estudiar la capacidad de disolución de diferentes soluciones.

**Tabla 8.** Parámetros químico-orgánicos evaluados en extractos de pulpa dental humana y bovina tanto vital como necrótica tomados de Salas y cols, 2011 (43).

**Tabla 9.** Proporción peso/volumen del tejido a disolver en soluciones.

**Tabla 10.** Estandarización del tejido pulpar bovino de los estudios sobre capacidad de disolución.

**Tabla 11.** Resultados de los estudios sobre disolución de tejido en los que emplean soluciones de NaOCl aisladas.

**Tabla 12.** Resultados de los estudios sobre disolución de tejido en los que emplean soluciones mezcladas de NaOCl con quelantes (EDTA o HEBP) mezclados.

**Tabla 13.** Reducción del contenido de cloro libre en soluciones mezcladas de NaOCl con agente quelante.

**Tabla 14.** Comparación en el porcentaje de pérdida de peso de tejido con el pH inicial y final del NaOCl.

### 11.3. ANEXO DE MÉRITOS.

#### Comunicación oral en el XXXVII Congreso Nacional de la Asociación Española de Endodoncia (AEDE) en San Sebastián.



[www.aede.info](http://www.aede.info)

DON ROBERTO AZA GARCÍA, con D.N.I. n° 02631951S, como Secretario- Tesorero de la Asociación Española de Endodoncia (AEDE), debidamente inscrita en el Registro Nacional de Asociaciones del Ministerio del Interior, en el Grupo 1º, Sección 1 a, Hoja Registral número nacional 172.439, por la presente,

#### CERTIFICA

Que Dña. Natalia Navarrete Marabini ha asistido al XXXVII Congreso Nacional ,celebrado en San Sebastian del 28 al 30 de Septiembre de 2016, habiendo presentado y defendido la siguiente Comunicación Oral:

"Análisis de la interacción del ácido etidróico con el hipoclorito sódico en la disolución de tejido pulpar bovino mediante flujo controlado."

Lo que certifica a los efectos oportunos, en Madrid, a 18 de Julio de 2017.

Fdo.: Roberto C. Aza García.  
Secretario-Tesorero de AEDE

Comunicación oral en el Congreso de la Asociación Americana de Endodoncia en New Orleans.

**OR57**

**Effect of the Alternate Delivery of Chelating Agents Under Controlled Flow on the Pulp Tissue Dissolution Ability of Sodium Hypochlorite**

*N. Navarrete\*<sup>1</sup>, J. Macorra<sup>1</sup>, T. Arias-Moliz<sup>2</sup>, A. Arias<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Complutense University of Madrid, Spain; <sup>2</sup>University of Granada, Spain


**Introduction:** The purpose of this study was to evaluate pulp tissue-dissolution ability of sodium hypochlorite (NaOCl) when alternated with etidronate (HEBP) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) under controlled flow. **Methods:** Bovine pulp was extracted from the lower incisors of ten bovine jaws (30-70 months old) dissected after death. Pulp specimens were standardized in size (1x3x10 mm), blotted dried and weighed using a hermetic precision electronic balance (initial weight (T<sub>0</sub>): mean=31.98 mg, SD=1.18). Specimens from the same bovine jaw were randomly assigned to two control (n=3 each) and four experimental groups (n=10 each): NC (negative control/distilled water), PC (positive control/6%NaOCl), G1 (3%NaOCl), G2 (3%NaOCl+17%EDTA), G3 (3%NaOCl+18%HEBP) and G4 (3%NaOCl+9%HEBP). Distilled water and NaOCl were provided with a delivery pump under a continuous controlled rate (1ml/min). A second pump alternately delivered either EDTA or HEBP with a 30 seconds programmed interval at the same rate. Percentage of tissue weight loss was calculated at 2, 5 and 10 minutes (T<sub>2</sub>, T<sub>5</sub> and T<sub>10</sub>) and compared among groups with ANOVA. Free available chlorine and pH were controlled at T<sub>0</sub> and T<sub>10</sub>. **Results:** No tissue was remnant in PC at T<sub>5</sub>. Tissue-dissolution was not observed in NC. There were no significant differences in the percentage of weight loss among experimental groups at any point in time. Some remnant tissue was found in G3 (1.4% ± 2.4) and G4 (1.6% ± 2.3) at T<sub>10</sub>, whereas nothing was left in G1 and G2. **Conclusions:** EDTA and HEBP delivered alternately under controlled flow did not affect tissue-dissolution ability of NaOCl.

Presentación en formato Póster en el PhDay de la Facultad de Odontología, UCM.



## EFECTO DEL FLUJO ALTERNANTE DE AGENTES QUELANTES (EDTA Y HEBP) SOBRE LA CAPACIDAD DE DISOLUCIÓN DEL HIPOCLORITO DE SODIO

NAVARRETE N., DE LA MACORRA JC., ARIAS A.  
Departamento de Odontología Conservadora y Prótesis.  
Facultad de Odontología, Universidad Complutense de Madrid.



**JUSTIFICACIÓN:** No existen estudios que investiguen el efecto de estos agentes quelantes (Na<sub>2</sub>EDTA y Na<sub>2</sub>HEBP) sobre la capacidad de disolución del hipoclorito de sodio (NaOCl) en tejido pulpar bovino controlando el flujo de la irrigación.

**OBJETIVO:** Determinar si el flujo controlado alternante del 17% Na<sub>2</sub>EDTA o 18% y 9% Na<sub>2</sub>HEBP afecta a la capacidad de disolución del 3% NaOCl sobre el tejido pulpar bovino.

**MATERIALES Y MÉTODOS**


**1. TEJIDO PULPAR BOVINO**



**2. CONSERVACIÓN DEL TEJIDO**




**3. ESTANDARIZACIÓN DEL TEJIDO**



1x3x10 mm

Media 31,98 mg  
DE=1,18

**4. TAMAÑO MUESTRAL (N=46, RANDOMIZADO)**



Mandíbula bovina n°2

**5. DISPENSACIÓN CONTROLADA**



Tiempo de exposición: 2, 5 y 10 min

**RESULTADOS**

Test Shapiro Wilk y ANOVA

TEJIDO REMANENTE (%)				
Grupos Control	2 minutos (T2)	5 minutos (T5)	10 minutos (T10)	
NC: Agua destilada	98,3 ± 0,4	111,1 ± 5,1	123,1 ± 6,3	
PC: 6% NaOCl	13,2 ± 2,3	0	0	

Tabla 1. Porcentaje de tejido pulpar bovino remanente en los grupos control a lo largo del tiempo.

TEJIDO REMANENTE (%)				
Grupos experimentales	2 minutos (T2)	5 minutos (T5)	10 minutos (T10)	
G1: 3% NaOCl	49,6 ± 14,3	12,24 ± 9,3	0	
G2: 3% NaOCl - 17% Na EDTA	52,3 ± 7,8	19,4 ± 6,8	0	
G3: 3% NaOCl - 18% Na HEBP	58 ± 10,7	18,5 ± 9,8	1,4 ± 2,4	
G4: 3% NaOCl - 9% Na HEBP	62,3 ± 7,9	23,2 ± 8,1	1,6 ± 2,3	

Tabla 2. Porcentaje de tejido pulpar bovino remanente en los grupos experimentales a lo largo del tiempo.

No existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales en ninguno de los tiempos.

**DISCUSIÓN**



Gráfico 1. Pérdida de porcentaje de peso del tejido pulpar bovino a lo largo de 10 min en los cuatro grupos experimentales.

Autores	Soluciones	Alternancia (frecuencia)	Inmersión	Remoción	RESULTADOS
Koskinen 1989	NaOCl	No	Si	Si	13 min a 100°C
Cunningham 1980	NaOCl	No	Si	Si	10 min a 100°C
Betz 2003	NaOCl	No	Si	Si	10 min a 100°C
Niemanen 2004	NaOCl	No	Si	Si	10 min a 100°C
Baillat 2011	NaOCl	No	Si	Si	10 min a 100°C
Almeida 2015	NaOCl	No	Si	Si	10 min a 100°C
Tartari 2017	NaOCl	No	Si	Si	10 min a 100°C

**CONCLUSIÓN:** EDTA y HEBP no alteraron la capacidad de disolución del NaOCl sobre el tejido pulpar bovino, cuando se utilizaron bajo un flujo continuo controlado. **RELEVANCIA CLÍNICA:** Poder usar de forma alternante el NaOCl y el quelante durante la instrumentación.

**Premio al mejor Póster en el PhDay de la Facultad de Odontología, UCM.**

**PhDay** Odontología

ESCUELA DE DOCTORADO  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

I PhDay Facultad de Odontología

**PREMIO MEJOR POSTER**

*Natalia Davarrete Harabini*

**SITUACIÓN ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN EN ODONTOLÓGÍA**  
¿CÚAL ES MI PAPEL EN LA CIENCIA?

*[Signature]*

D. José Carlos de la Macorra García  
Decano de la Facultad de Odontología  
Universidad Complutense de Madrid

*[Signature]*

D. Emilio Peraf Vega  
Director de la Escuela de Doctorado  
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 20 de diciembre de 2017

**Ponencia sobre los factores que afectan a la irrigación en el XIV Simposium Nacional de Endodoncia celebrado en Madrid.**



