

UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTO TORIBIO DE MOGROVEJO
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA



INFLUENCIA DE LA DENTINA EN EL EFECTO ANTIBACTERIANO DE 2
CONCENTRACIONES DE HIPOCLORITO DE SODIO EN EL
CRECIMIENTO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ATCC 29212

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
CIRUJANO DENTISTA

AUTORES:
MARTÍNEZ OROSCO, SAMANTHA
MENDOZA RODRIGO, SOLANGE CONSUELO

Chiclayo, 13 de febrero de 2019

INFLUENCIA DE LA DENTINA EN EL EFECTO
ANTIBACTERIANO DE 2 CONCENTRACIONES DE
HIPOCLORITO DE SODIO EN EL CRECIMIENTO DE
ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212

PRESENTADA POR:
MARTÍNEZ OROSCO SAMANTHA
MENDOZA RODRIGO SOLANGE CONSUELO

A la Facultad de Medicina de la Universidad Católica Santo Toribio de
Mogrovejo para optar el título de:

CIRUJANO DENTISTA

APROBADA POR:

Mgtr. CD. Rocio Lizet Torres Verastegui

PRESIDENTE

Mgtr. CD. Carmen Lizet Diaz Silva

SECRETARIO

Mgtr. CD. Rosa Josefina Roncal Espinoza

ASESOR

Agradecimientos

A Dios, por estar siempre presente con nosotras en cada paso que damos, iluminarnos y cerrar un capítulo más de nuestras vidas satisfactoriamente.

A nuestros padres por ser el pilar fundamental en nuestra educación; tanto académica como de la vida y por su incondicional apoyo durante todo este tiempo.

De manera especial, a nuestro tutor de tesis por habernos guiado en la elaboración de este trabajo de titulación y habernos brindado el apoyo para desarrollarnos profesionalmente.

Dedicatoria

A nuestros padres, quienes nos apoyaron y nos dieron sus consejos en todo momento, además colaboraron en el cumplimiento de esta meta.

Resumen

Este estudio *in vitro* evaluó la influencia de la dentina sobre el efecto antibacteriano contra *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 de 2 concentraciones de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) 2.5% y 5%. Se empleó polvo de dentina a partir de dientes humanos (84 µg/ml) y la supervivencia de la bacteria se evaluó realizando recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a los 10, 30 y 60 segundos. Los datos se analizaron con la prueba estadística ANOVA factorial no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con dentina y sin dentina concluyendo que la dentina en este estudio no influyó en el efecto antibacteriano del Hipoclorito de Sodio en ninguna concentración, ni en los tiempos.

PALABRAS CLAVE: dentina, Hipoclorito de Sodio, *Enterococcus Faecalis*.

Abstract

This in vitro study evaluated the influence of dentin on the antibacterial effect against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 of 2 concentrations of Sodium Hypochlorite NaOCl 2.5% and 5%. Dentin powder was used from human teeth (84 µg/ml) and the survival of the bacteria was evaluated by counting colony forming units (CFU) at 10, 30 and 60 seconds. The data were analyzed with the statistical ANOVA factorial test, finding no statistically significant differences between the groups with and without dentin concluding that the dentin in this study had no inhibitory effect on antibacterial activity of Sodium Hypochlorite and any concentration, nor over time.

Keywords: dentin; Sodium Hypochlorite, *Enterococcus Faecalis*.

Índice

Agradecimientos	3
Dedicatoria	4
Resumen	5
Abstract	6
I. Introducción	8
II. Marco Teórico	
2.1 Antecedentes del problema	9
2.2 Bases teórico científicas	10
III. Metodología	
3.1 Tipo y nivel de investigación	14
3.2 Diseño de investigación	14
3.3 Unidad de análisis	14
3.4 Criterios de selección	14
3.5 Operacionalización de variables	16
3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	17
3.7 Procedimientos	17
3.8 Plan de procesamiento y análisis de datos	20
3.9 Matriz de consistencia	21
3.10 Consideraciones éticas	22
IV. Resultados y discusión	22
V. Conclusiones	26
VI. Recomendaciones	27
VII. Lista de referencias	28
VIII. Anexos	30

I. Introducción

Se ha aceptado durante muchos años que los microorganismos son el principal agente etiológico de la patología pulpar y periapical., siendo la persistencia de éstos la principal causa del fracaso del tratamiento endodóntico¹. La preparación biomecánica es imprescindible para la eliminación de la estructura dental infectada pero también es necesario desinfectar los conductos radiculares con medios químicos.²

El hipoclorito de sodio (NaOCl) sigue siendo el irrigante de elección, debido a su capacidad para disolver tejido orgánico y su acción contra los microorganismos, pero es incapaz de eliminar la capa de frotis para evitar la acumulación de restos de tejido duro.³

Áreas complejas o la presencia de un ambiente químico complejo que contiene productos orgánicos e inorgánicos, como la pulpa necrótica, residuos dentinarios y biofilms pueden estar relacionados con el fracaso del irrigante.⁴ Diferentes agentes desinfectantes muestran diferente sensibilidad a la acción de los diversos inactivadores potenciales, como la dentina, las proteínas séricas, la hidroxiapatita, el colágeno derivado de diferentes fuentes y la biomasa microbiana.⁵

Los componentes de los residuos de dentina pueden actuar como una barrera que disminuye la actividad antimicrobiana del NaOCl, dado que este reacciona con la materia orgánica e inorgánica, lo que resulta en una pérdida de su cloro disponible, causando la desgasificación de la solución. Ante esta condición surge la necesidad de buscar más evidencia científica acerca de ésta inhibición.⁶⁻⁷

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la influencia de la dentina en el efecto antibacteriano de 2 concentraciones de NaOCl en el crecimiento de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, de comprobar esto, podría servir como aporte a futuras investigaciones y tener ciertas consideraciones en el tratamiento de conductos, además de ampliar nuestros conocimientos.

II. Marco teórico

2.1. Antecedentes del problema:

Haapasalo et al⁴ investigaron la inactivación que realiza la dentina sobre la actividad antibacteriana del calcio saturado, Hipoclorito de Sodio al 1 %, acetato de clorhexidina al 0,5% y 0,05%. La dentina se esterilizó y trituró, colocando dichos compuestos simultáneamente en un tubo de ensayo junto con la bacteria *Enterococcus Faecalis* A197A. Las muestras del cultivo bacteriano, se tomaron a los 5 min, 1 hora y a las 24 horas después de agregar las bacterias; obteniendo por resultado que en los experimentos de control sin polvo de dentina todos los medicamentos mataron por completo al E. faecalis, el hidróxido de calcio sobre E. faecalis fue totalmente abolido por la presencia del polvo de. El efecto de 0.05% de clorhexidina e Hipoclorito de sodio al 1% en E. faecalis fue reducido pero no totalmente eliminado por la presencia de dentina, en conclusión la dentina tenía un efecto inhibitor sobre todos los medicamentos ensayados y que esto se debía a su efecto de amortiguación, grado de concentración y tiempo de pre incubación del medicamento con la dentina.

Portenier I et al⁸ investigaron la actividad antibacteriana de MTAD (mezcla de isómero de tetraciclina, ácido y detergente) al 100, 10 y 1% , clorhexidina sin cetrimida 0,2, 0,02 y 0,01% y clorhexidina con cetrimida 0.1, 0.01 y 0.01 % hacia dos cepas de *Enterococcus Faecalis*. Las sustancias probadas para la inhibición de la actividad antibacteriana de los medicamentos fueron polvo de dentina y BSA (Albumina sérica bovina). Las muestras dieron como resultado que en concentración completa de MTAD (100%) y CHX (0,2%) sin polvo de dentina rápidamente mató por completo a ambas cepas a la hora. MTAD, CHX y CHX / CTR fueron inhibidos por dentina y BSA a las 24 horas al en comparación con controles negativos.

Arias et al¹ realizaron un estudio cuyo objetivo fue determinar la influencia del polvo de dentina en la concentración, el pH y la actividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio (NaOCl) solo y combinado con ácido etidróico (HEBP). Se cultivaron biopelículas de *Enterococcus Faecalis* en la superficie de bloques de dentina durante 5 días y luego se expusieron a NaOCl al 1% y al 2.5% solo o en combinación con HEBP al 9% durante 3 minutos en ausencia y presencia de polvo de dentina. Se midieron los biovolúmenes de la biopelículas, el cloro disponible y el pH de las soluciones. Dando por resultado que la presencia de polvo de dentina redujo el cloro y el pH disponibles en todas las soluciones de irrigación.

Portenier I et al⁹ al realizaron un estudio donde comparó la inhibición del efecto antibacteriano de la solución saturada de hidróxido de calcio, hipoclorito de sodio al 0.5% y 0,2 % / 0,4 % yodo

yoduro de potasio mediante polvo de dentina (DP), hidroxiapatita (HA) y albúmina sérica bovina (BSA). Todas las soluciones se incubaron con los posibles inhibidores DP, HA y BSA en 50 ul de agua por 1 hora antes de agregar la suspensión bacteriana. Las muestras se tomaron después de 1 y 24 h después de agregar la bacteria. Dando por resultado que el hidróxido de calcio se inactivo totalmente por la presencia de DP, HA o BSA. El hipoclorito de sodio (0.5%) fue fuertemente inhibida por BSA y disminuyó con la dentina. Sin embargo, el AH tuvo poco o ningún efecto inhibitorio sobre la clorhexidina. El efecto antibacteriano del 0,2 / 0,4% de yoduro de potasio yódico sobre E. faecalis fue totalmente inhibido por la dentina, pero prácticamente no se vio afectado por HA o BSA. El yoduro de potasio yodado no se inhibió en absoluto con la dentina. Sin embargo, el efecto de la solución saturada de hidróxido de calcio fue eliminado totalmente por la dentina, en las cuatro concentraciones.

2.2. Bases teórico científicas:

2.2.1 Dentina

2.2.1.1 Definición

La dentina es el principal tejido duro del diente, situado entre el esmalte o el cemento y la pulpa; consiste en túbulos dentinarios rodeados de dentina peritubular altamente mineralizada y dentina intertubular, además tiene una química hidratada compleja. Su composición muestra algunas variaciones dependiendo de la ubicación, edad del diente e irritación externa (caries o procesos de reabsorción).⁴

2.2.1.2 Composición

De los tejidos duros dentales, la dentina es químicamente la más cercana al hueso. En peso el 70% de la biomasa de la dentina son compuestos inorgánicos, el resto son compuestos orgánicos 20% y agua 10%. Por volumen los números correspondientes son 45%, 33% y 22%, respectivamente. Sus componentes inorgánicos son compuestos de fosfato de calcio, principalmente apatita, también se pueden encontrar pequeñas cantidades de magnesio, sodio, cloruro, potasio, carbonato, fluoruro, etc. El colágeno tipo I es su principal componente orgánico (90%) y varias otras proteínas no colágenas que se encuentran presentes, pero en menor cantidades.

En pocas palabras se puede decir que la dentina es como una matriz de colágeno tipo I rodeada por cristales de apatita.⁴

La biomasa microbiana en el sistema de conductos puede contribuir considerablemente a la cantidad total de material orgánico presente. Por lo tanto, es obvio que las soluciones de irrigación del conducto radicular y los medicamentos interactuarán con una variedad de compuestos orgánicos en el sistema de canales, y esta interacción podría afectar el potencial antibacteriano de los desinfectantes endodónticos.⁴

Espina dorsal orgánica: Colágeno tipo I

El colágeno tipo I es el colágeno más abundante en la dentina, aunque también se han reportado pequeñas cantidades de colágenos tipo III y V. El colágeno de tipo I tiene mayores proporciones de hidroxilisina, como resultado tiene más reticulaciones intramoleculares / intermoleculares que el colágeno tipo I en la piel o en el hueso. Las reticulaciones aumentan la estabilidad estructural y la resistencia de las fibras de colágeno de la dentina. También contribuyen a que el colágeno de la dentina sea relativamente insoluble en soluciones ácidas y neutras en comparación con el colágeno de la mayoría de las otras fuentes. Como consecuencia, el grabado ácido de la dentina elimina principalmente la fase mineral, mientras que el colágeno permanece casi intacto.⁴

Minerales inorgánicos de dentina: Apatita

El contenido de minerales en la dentina se compone principalmente de apatitas no homogéneas.⁴

La hidroxiapatita está rodeada por una capa de iones adsorbidos y agua. Pequeñas cantidades de elementos inorgánicos podrían ser detectadas en la red de apatita o adsorbidas a la superficie del cristal. La capa de hidratación que rodea los cristales de apatita facilita la posibilidad de difusión de iones en ambas direcciones, permitiendo la adsorción de iones incluso grandes. Se sugiere que casi un tercio de los iones es intercambiable. Por lo tanto, la capa de hidratación y el intercambio / adsorción de iones permiten cambios en el microambiente químico, reflejando presiones externas tales como pH e interacción con diversos compuestos químicos.⁴

2.2.1.3 Interacción de la dentina con el agente irrigante

El contacto de NaOCl con la dentina provoca el agotamiento del cloro libre disponible, resultando en la degradación de la proteína, además de un aumento de la temperatura y cambios en el nivel de pH.^{4,10}

Se propone que los materiales orgánicos, como los componentes de la dentina o restos de tejidos, pueden interactuar con los irrigantes, y ésta interacción de sustrato inhibe competitivamente la reacción entre el irrigante y las bacterias. Por esta razón, es posible que tener más sustrato orgánico interactuando con la solución de riego puede retrasar inherentemente la eliminación de bacterias.⁴

2.2.2 Hipoclorito de Sodio

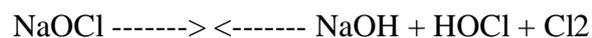
2.2.2.1 Definición

Es un compuesto halogenado que según la Asociación Americana de Endodoncistas ha sido definido como un líquido claro, pálido, verde amarillento, extremadamente alcalino (pH 11,8) y con fuerte olor clorino. Presenta una acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos, además, es un potente agente antimicrobiano.⁶

El hipoclorito de sodio (NaOCl) ha sido usado como irrigante intraconducto para la desinfección y limpieza por más de 70 años. Es un agente efectivo y de amplio espectro contra microorganismos patógenos: Gram positivos, Gram negativos, hongos, esporas y virus. Además de su acción antimicrobiana es ampliamente utilizado por su capacidad para disolver tejido orgánico. El NaOCl es una base fuerte y deriva su capacidad para disolver los tejidos orgánicos por alto nivel de pH 12.¹¹

Según Zehnder, el irrigante ideal del conducto radicular debe tener un amplio espectro antimicrobiano, disolver el tejido necrótico de la pulpa, inactivar la endotoxina, prevenir o eliminar la capa de frotis, ser no tóxico y no cáustico para los tejidos periodontales. Aunque NaOCl no cumple plenamente con su descripción de un irrigante ideal, cumple con muchos de sus requisitos, además de tener propiedades antibacterianas, es fácilmente disponible, bajo costo y tiene una larga vida útil.¹²

Las soluciones de hipoclorito de sodio exhiben un equilibrio dinámico de acuerdo a la siguiente ecuación.⁶



El hidróxido de sodio es un potente solvente orgánico y de grasa formando jabón (saponificación). El ácido hipocloroso (HOCl) además de un solvente de tejido es un potente antimicrobiano porque libera cloro naciente que se combina con el grupo amina de las proteínas formando cloraminas. El ácido hipocloroso sufre una descomposición

por acción de la luz y del calor liberando cloro libre y secundariamente oxígeno naciente. Las acciones del ácido hipocloroso dependen de su pH.³

El cloro afecta a una amplia gama de microbios incluyendo virus y hongos, y el oxígeno elimina a las bacterias anaeróbicas prevalentes en la enfermedad endodóntica.³

2.2.2.2 Mecanismo de acción

Según Estrela y et al. Las acciones del hipoclorito de sodio operan mediante tres mecanismos.¹²

a) Saponificación, donde actúa como un solvente orgánico que degrada los ácidos grasos hacia sales ácidas grasosas (jabón) y glicerol (alcohol), reduce la tensión superficial de la solución remanente.¹²

b) Neutralización, donde el hipoclorito de sodio neutraliza aminoácidos formando agua y sal.¹²

c) Cloraminación. La reacción entre el cloro y el grupo amino forma cloraminas que interfieren en el metabolismo celular. El cloro posee una acción antimicrobiana inhibiendo enzimas esenciales de las bacterias por medio de oxidación.¹²

La acción bactericida y de disolución de tejidos del hipoclorito de sodio puede ser modificada por tres factores: concentración, temperatura y pH de la solución.¹²

El efecto antimicrobiano de las soluciones de NaOCl depende de su cloro disponible libre, que consiste en ácido hipocloroso y el ion hipoclorito¹⁵, dicho equilibrio influirá en el efecto biológico del NaOCl, que puede definirse como su capacidad de disolución del tejido y el efecto antimicrobiano.²

Para eliminar los microorganismos del conducto radicular, los agentes desinfectantes deben entrar en contacto con las células microbianas. El resultado de la interacción directa del medicamento con el microbio no es sólo la muerte de este, sino también el debilitamiento e inactivación gradual del producto químico desinfectante. Las sustancias inactivadoras de NaOCl, tales como la biomasa bacteriana, el colágeno dentinario y la patogenicidad de las biopelículas multi-especies, consumen rápidamente NaOCl y contrarrestan su efecto. Entonces, se necesitan tiempos de exposición más largos para eliminar los biofilms formados en la dentina infectada in situ.¹²

2.2.3 Microorganismos en el canal radicular

Nuestro conocimiento acerca de la capacidad relativa de las diferentes especies para invadir la dentina es todavía bastante limitado, los cocos facultativos Gram positivos (*Enterococcus* y *Streptococcus*), *Lactobacilos* y *Actynomices* están entre los mejores invasores, mientras que muchos Gram negativos, al menos in vitro, parecen tener dificultades para penetrar en los túbulos dentinarios del conducto radicular principal.^{13, 14}

La micro biota presente en los dientes donde el tratamiento endodóntico fracasó, es predominantemente anaerobia facultativa y Gram positiva, siendo el *Enterococcus Faecalis* la especie que se aísla con mayor frecuencia.¹⁵

Enterococcus Faecalis es un coco gram positivo anaeróbico facultativo que está presente en el 24% -74% de las infecciones endodónticas asintomáticas y persistentes.¹² Algunas de las razones que contribuyen a la resiliencia de *Enterococcus Faecalis* son su capacidad para sobrevivir largos períodos de privación nutricional, su excelente capacidad para invadir los túbulos dentinarios y unirse a la dentina y el colágeno, y su capacidad para mantener la homeostasis del pH. En un intento de mejorar la tasa de éxito del tratamiento endodóntico, es importante dirigirse a las bacterias responsables de fallas del conducto radicular como parte de los diseños del estudio.¹⁶

III. Metodología

3.1. Enfoque de investigación: cuantitativo

3.2. Nivel de investigación: explicativo

3.3. Tipo de investigación; Experimental, longitudinal, analítico, prospectivo

3.4. Unidad de análisis

Placas Petris conformadas por cepa de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212.

3.5. Criterios de selección

Se recolectaron piezas dentales de humanos (premolares) que cumplan con los siguientes criterios.

Criterios de inclusión:

- Extraídos por motivos ortodónticos.
- Periodo máximo transcurrido desde su extracción 15 días.

- Almacenados desde su extracción en cloruro de sodio.

Criterios de exclusión:

- Dientes con lesión cariosa.
- Dientes con ápice abierto.

3.6. Operacionalización de variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Valor final	Tipo de variable	Escala de mediciones
Dentina	Conforma el mayor volumen del órgano dentario. Principal tejido duro del diente. ⁴	Dentina molida (polvo) de piezas dentales de humanos extraída a través de una máquina.	Polvo de dentina agregado o no en tubos de ensayo	Con dentina Sin dentina	Categórica	Nominal
Concentración del Hipoclorito de Sodio	Es la cantidad de sustancia de soluto por cada litro de disolución. ⁷	Obtención de diferentes concentraciones de hipoclorito diluidas con agua destilada	Grado de concentración	2.5 % 5%	Numérica	Razón
Efecto Antibacteriano	Acción capaz de eliminar las bacterias o inhibir su crecimiento y desarrollo sin dañar el ambiente que las porta. ¹	Acción capaz de eliminar las bacterias o inhibir su crecimiento y desarrollo sin dañar el ambiente que las porta. ¹	Porcentaje de muerte de células	%	Numérica	Razón
Tiempo de observación	Período determinado en el que se realiza una acción o se desarrolla un acontecimiento. ¹⁷	Tiempo que pasa desde el primer contacto del microorganismo con los tratamientos.	Cronómetro	10'' 30'' 60''	Numérica	Razón

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Técnica: Observación directa en Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Universidad Nacional de Trujillo.

Instrumento: Ficha de recolección de datos (ANEXO N°04)

3.8. Procedimientos

1. Se solicitó la aprobación del proyecto de investigación al Comité de Bioética y de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo.(ANEXO N° 01)
2. Se solicitó el uso del Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Universidad Nacional de Trujillo y el Laboratorio de Física de la Universidad Privada Antenor Orrego.(ANEXO N ° 02)

Los siguientes procedimientos se llevaron a cabo por las alumnas investigadoras:¹⁷

A. Obtención de la muestra

La cepa bacteriana de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 se compró en GEN LAB DEL PERU S.A.C

B. Obtención de las piezas dentarias

Se recolectaron premolares extraídos por motivo ortodónticos y donados voluntariamente (ANEXO N° 03).

C. Preparación del polvo de dentina

1. Se eliminó el cemento con discos carburo de silicio, y se retiró el tejido pulpar utilizando limas file K.

2. Se lavaron con solución salina fisiológica para eliminar cualquier residuo y se secaron por inmersión.

3. Se molió la dentina radicular utilizando un molino eléctrico modelo IKA A11 basic durante 10 minutos.

4. Se esterilizó en autoclave 121° x 15'y se colocó colocaron 84 mg de polvo de dentina en alícuotas de 150 µl de agua destilada y se almacenó a 4°C hasta su utilización.

D. Soluciones de riego probadas

Las soluciones de irrigación fueron NaOCl al 5 % y al 2.5 %. Se empleó agua destilada esterilizada como control negativo en los ensayos.

Los siguientes procedimientos se llevarán a cabo por el microbiólogo:

E. Suspensión bacteriana

1. La cepa *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 se reactivó sobre agar de infusión cerebro-corazón (BHI) por 12 horas.
2. Se observó su pureza de la cepa mediante tinción Gram y reacción catalasa, estableciéndose su viabilidad por medio de la turbidez del medio de cultivo.
3. Se realizó una suspensión bacteriana en 5 ml de solución salina esterilizada.
4. Se ajustó mediante un espectrofotómetro hasta lograr una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente estándar de 0,5 en la escala de McFarland. (El objetivo de este procedimiento fue establecer el número estimado de bacterias por ml de fluido, correspondiente a una densidad bacteriana de $1,5 \times 10^8$ cel / ml).

F. Actividad antibacteriana (sin polvo de dentina)

Para el primer y segundo tratamiento:

1. En el primer tratamiento se utilizó 150 ul de Hipoclorito de Sodio al 2.5 % y 150 ul de agua destilada.
2. De la suspensión bacteriana previamente preparada se extrajeron 150 ul para mezclarlos con las soluciones del primer tratamiento.
3. El tiempo 10, 30 y 60 segundos se contabilizó desde el momento en que la suspensión bacteriana entró en contacto con la solución del primer tratamiento.
4. Se retirarán 50 ul de cada microtubo con todas las soluciones homogenizadas y se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-3} . Los 3 tubos, en la dilución de series; contenían un inactivador (reduce el efecto remanente de la solución de irrigación). Se utilizó el siguiente inactivador: tiosulfato de sodio al 0,5% para NaOCl.
5. Se extrajeron 100 ul de la última dilución, se cultivaron en placas petris con agar BHI correctamente rotuladas y se incubaron a 37 °C.

6. En el segundo tratamiento se repitió el procedimiento previamente explicado con la diferencia que se utilizó Hipoclorito de Sodio al 5 %.

7. Se contaron las colonias bacterianas después de 24 horas para ambos tratamientos.

Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado.

G. Inhibición de la actividad antibacteriana (con polvo de dentina)

Para el tercer y cuarto tratamiento:

1. En el tercer tratamiento se utilizó 150 ul de Hipoclorito de Sodio al 2.5 % y 150 ul de agua destilada con 84 mg de dentina.

2. De la suspensión bacteriana previamente preparada se extrajeron 150 ul para mezclarlos con las soluciones del tercer tratamiento.

3. El tiempo 10, 30 y 60 segundos se contabilizó desde el momento en que la suspensión bacteriana entró en contacto con las soluciones del primer tratamiento.

4. Se retiraron 50 ul de cada microtubo con todas las soluciones homogenizadas y se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-3} . Los 3 tubos, en la dilución de series; contenían un inactivador (reduce el efecto remanente de la solución de irrigación). Se utilizará el siguientes inactivador: tiosulfato de sodio al 0,5% para NaOCl.

5. Se extrajo 100 ul de la última dilución, se cultivaron en placas petris con agar BHI correctamente rotuladas y se incubaron a 37 °C.

6. Para el cuarto y último tratamiento se repitió el mismo procedimiento con la diferencia que se utilizó Hipoclorito de Sodio al 5 %.

7. Se contaron las colonias bacterianas después de 24 horas para ambos tratamientos.

H. Control negativo

1. Se mezclaron 300 ul de agua destilada con 150 ul de suspensión bacteriana previamente preparada, el tiempo 10, 30 y 60 segundos se contabilizaron desde el momento en que ambas soluciones entraron en contacto.

2. Se retiraron 50 ul del microtubo con ambas soluciones homogenizadas y se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} .

3. Se extrajeron 100 ul de la última dilución, se cultivarán en placas petris con agar BHI correctamente rotuladas y se incubaron a 37 °C.

4. Se contaron las colonias bacterianas después de 24 horas del control negativo.

Al finalizar los procedimientos todo material biológico se auto clavó y se eliminó como residuo no peligroso en los lavatorios.

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos

Los datos experimentales fueron registrados en una base de datos en IBM SPSS Statistics para ser procesados y presentados en tablas mostrando la influencia de la dentina en el efecto antibacteriano de cada concentración del Hipoclorito de Sodio en el crecimiento de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212; se empleará la prueba estadística ANOVA FACTORIAL para muestras independientes donde se evaluó la interacción de todas las variables.

3.9. Matriz de consistencia

Pregunta de Investigación	Hipótesis	Objetivo	Metodología	Unidad de análisis
¿La presencia de dentina influye en el efecto antibacteriano de 2 concentraciones de Hipoclorito de Sodio en el crecimiento de <i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212?	La presencia de dentina influye en el efecto antibacteriano del hipoclorito de sodio en el crecimiento de <i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212?	General: Evaluar la influencia de la dentina en el efecto antibacteriano del Hipoclorito de Sodio al 2,5 % y 5 % en el crecimiento de <i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212 a los 10, 30 y 60 segundos.	Enfoque de investigación: Cuantitativo Nivel de investigación: Explicativo Tipo de Investigación: Experimental ,longitudinal, analítico , prospectivo	Placas Petris conformadas por <i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212, Hipoclorito de Sodio al 2.5 % y 5 % divididas en grupos con dentina y sin dentina.

3.10. Consideraciones éticas

En ésta investigación de tipo experimental, in vitro:

Se utilizó polvo de dentina de piezas dentales de humanos que fueron extraídos por motivos ortodónticos, y donados voluntariamente por los centros de salud, hospitales y/o consultorios privados. (ANEXO N° 04)

Se consideró los protocolos de bioseguridad para la manipulación de los materiales y soluciones a utilizar en el laboratorio: Cepa de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, Hipoclorito de Sodio y dentina en polvo.

No se realizó ninguna prueba directa en humanos y/o animales.

IV. Resultados y discusión

Resultados

El propósito del estudio fue evaluar la influencia de la dentina en el efecto antibacteriano de 2 concentraciones de NaOCl en el crecimiento de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212.

Los grupos experimentales se evaluaron en placas petris, conformadas por cepa de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, Hipoclorito de Sodio al 2,5 %; 5 % y divididas en grupos sin dentina y con dentina.

Al evaluar los grupos sin dentina y con dentina con ambas concentraciones de Hipoclorito de Sodio y en todos los tiempos determinados no se encontró diferencia estadísticamente significativa aplicando la prueba estadística Anova Factorial para muestras independientes obteniendo un p-valor de 0.533. (Ver tabla 1)

Tabla 1. Evaluación de la influencia de la dentina en el efecto antibacteriano de 2 concentraciones de Hipoclorito de Sodio en el crecimiento de *Enterococcus Faecalis* ATCC

	Sin dentina		Con dentina	
	Hipoclorito de sodio al 2.5 %	Hipoclorito de sodio al 5 %	Hipoclorito de sodio al 2.5 %	Hipoclorito de sodio al 5 %
10''	99,99120%	99,99760%	99,99200%	99,99660%
30''	99,99560%	99,99940%	99,99660%	99,99980%
60''	99,99760%	99,99960%	99,99760%	99,99980%

p 0.533*

Discusión

Dentro del sistema del canal radicular, el NaOCl reacciona con la materia orgánica e inorgánica, lo que resulta en una pérdida de su cloro disponible ya sea por la reacción con contenido orgánico de la dentina, reacción de la pulpa residual, los desechos y /o sangre, reacción con el material del instrumento activado y la activación, lo que provoca la desgasificación de la solución.

Al estudiar esta reacción del NaOCl en presencia de dentina del canal radicular, la eficacia química y el porcentaje de pérdida de cloro, son variables importantes. Esta reacción del NaOCl junto con la capacidad de disolución en los tejidos se ven influenciados por varios parámetros como: tiempo de exposición, área de contacto, temperatura, interacción con otros productos químicos y nivel de pH.

A partir de ello, en este estudio se evaluó la influencia de la dentina en el efecto antibacteriano del Hipoclorito de Sodio al 2,5 % y 5 % en el crecimiento de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 a los 10, 30 y 60 segundos.

Se utilizó dentina en polvo al igual que en estudios *in vitro* anteriores debido a que una sustancia pulverizada o con un gran estado de división tiene una mayor velocidad de reacción ya que existe más área de contacto, y por tanto mayor facilidad de colisión entre partículas¹⁸, siendo diferente a las condiciones de la cavidad oral.⁴

Por otro lado Portenier et al, estudiaron el efecto inhibidor potencial de la matriz dentinaria bovina (colágeno), el polvo de dentina desmineralizada (tratado con EDTA o ácido cítrico) y el colágeno de la piel sobre la actividad antibacteriana de 0.1% NaOCl y 0,1% / 0,2% IKI. La matriz de dentina (3% p / v), que es principalmente colágeno dentinario purificado, era un potente inhibidor de NaOCl e IKI, con la mayoría de las células de *Enterococcus Faecalis* sobreviviendo después de 24 horas de incubación con los medicamentos en las concentraciones dadas. Las propiedades orgánicas de la dentina se alteran en diversas condiciones de esterilización.⁹

El presente estudio al no encontrar efecto inhibitorio por parte de la dentina frente a la acción del Hipoclorito de Sodio, llevó a conjeturar que se alteraron los componentes orgánicos de la

dentina, los cuales son causantes de dicho efecto inhibitorio; debido al método esterilización (autoclave), como lo afirma White et al. quienes investigaron la esterilización de raíces de los dientes enteros usando radiación gamma y esterilización en autoclave de vapor y encontró que el primero no tuvo ningún efecto significativo sobre la estructura de la dentina, mientras que el segundo indujo una pérdida de componentes minerales y de colágeno de la superficie de la muestra.¹⁸

Existen estudios in vitro que hablan sobre varias razones para que el rendimiento in vivo de los irrigantes sea más pobre en comparación con los resultados in vitro. Estos incluyen la penetración deficiente del irrigante, la presencia de un ambiente químico complejo que contiene una mezcla de productos orgánicos e inorgánicos (pulpa necrótica, residuos dentinarios y biofilms), la baja concentración, el tiempo de exposición corto, el volumen, el intercambio deficiente de los irrigantes en las partes apicales del canal de la raíz, la acumulación de residuos de dentina puede influir en la actividad biológica de las soluciones de irrigación.⁴

Así mismo, es importante tener en cuenta la metodología in vitro aplicada en este estudio. Los resultados relacionados con los procesos de inactivación de las soluciones de riego dentro del sistema de conductos parecen ser diversos y más complejos cuando están presentes diferentes cantidades de desechos y capa de frotis, así como el tejido orgánico, que también influye en la actividad biológica de las soluciones.⁴

Pocas son las investigaciones que evalúan los inhibidores potenciales como la dentina dentro del canal radicular, el presente estudio puede ser importante para impulsar futuros estudios in vivo donde se asemeje a las condiciones orales.

V. Conclusiones

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los grupos con dentina y sin dentina lo que nos lleva a concluir en este estudio que la dentina no influye en el efecto antibacteriano de 2 concentraciones de Hipoclorito de Sodio en el crecimiento de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212.

VI. Recomendaciones

Realizar más estudios para evaluar la inhibición por parte de los componentes orgánicos de la dentina que no se hayan alterado por condiciones de esterilización.

Evaluar también componentes inorgánicos de la dentina para determinar si éstos podrían o no ejercer algún efecto inhibitorio.

VII. Lista de referencias

1. Arias M, Morango A, Ordinola R, Ferrer C, Ruiz M, Baca P. Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid. *Int Endod J.* 2016; 42(5): 771-75.
2. Arias MT, Ordinola R. Baca P, Ruiz M, Ferrer CM. Antimicrobial Activity of a Sodium Hypochlorite/Etidronic Acid Irrigant Solution. *Res Technol.* 2014; 40(12): 1999-2002.
3. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J.* 2000; 33(2):126–31.
4. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of Dentin on the antimicrobial Properties of Endodontic Medicaments. *Rev Art.* 2014; 33(8):917-25.
5. Baker RW. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins: 1. Physico-chemical study of the course of the reaction. *Biochem J.* 1947; 41(3): 337–42.
6. Christensen CE, McNeal SF, Eleazer P. Effect of lowering the pH of sodium hypochlorite on dissolving tissue in vitro. *JOE.* 2013; 34(4):449–52.
7. Siqueira J , Rôças I, Favieri A, Lima C. Chemomechanical reduction of the bactericidal population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1, 2.5, and 5.25% sodium hypochlorite. *JOE.* 2000; 26(6): 331-3.
8. Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *JOE.* 2006; 32(2):138– 41.
9. Portenier I, Haapasalo H, Ørstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heatkilled microbial whole cells. *J Endod* 2002; 28:634 –7.
10. Camps J, Pashley DH. Buffering action of human dentin in vitro. *J Adhes Dent.* 2000; 2(1):39 –50.

11. Gomes R, Pascual N, Wesselink P, Versluis M. Influence Of the Dentinal Wall on the pH of Sodium Hypochlorite during Root Canal Irrigation. *Res Technol.* 2014; 40(7):1006-8.
12. Zehnder M. Root canal irrigants. *JOE.* 2015; 32(5):389–98.
13. Haapasalo M, Endal U. Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Topics.* 2003; 6:29–56.
14. Macedo R, Wesselink P, Zaccheo F, D. Fanali. Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. *Int Endod J.* 2015; 43(12):1108–15.
15. Perez F, Calas P, Rochd T. Effect of dentin treatment on in vitro root tubule bacterial invasion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 82(4):446 –51
16. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32:93–8.
17. Dornelles R, Singh A. Dentin Inhibits the Antibacterial Effect of New and Conventional Endodontic Irrigants. *Int Endod J.* 2013; 39:406-10.
18. White JM, Goodis HE, Marshall SJ, Marshall GW. Sterilization of teeth by gamma radiation. *Journal of Dental Research* 1994; 73: 1560-7

VIII. Anexos

ANEXO N° 01



CONSEJO DE FACULTAD
RESOLUCIÓN N° 316-2018-USAT-FMED
Chiclayo, 12 de abril de 2018

Vista la solicitud N° 149050 de fecha 11 de abril de 2018 que adjunta el documento de aprobación emitido por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina del Proyecto de Investigación de las estudiantes Martínez Orosco Samantha y Mendoza Rodrigo Solange Consuelo, de la Escuela de Odontología.

CONSIDERANDO:

Que esta investigación forma parte de las áreas y líneas de investigación de la Escuela de Odontología.

Que el proyecto de Investigación denominado: **Influencia de la dentina en el efecto antibacteriano de 2 concentraciones de hipoclorito de sodio en el crecimiento de *enterococcus faecalis* ATCC 29212**, fue aprobado por el Comité Metodológico de la Escuela de Odontología y el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina.

En uso de las atribuciones conferidas por la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo;

SE RESUELVE:

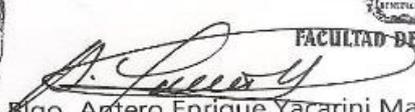
Artículo 1º.- Declarar aprobado el Proyecto de Investigación para continuar con el proceso de recolección de datos y finalización del mismo.

Artículo 2º.- Disponer que las estudiantes gestionen ante las instituciones pertinentes las facilidades para la recolección de información.

Regístrese, comuníquese y archívese.



SECRETARÍA ACADÉMICA
FACULTAD DE MEDICINA


MSc. Bigo. Antero Enrique Yacarini Martínez
Secretario Académico
Facultad de Medicina



FACULTAD DE MEDICINA


Méd. Jorge Luis Limo Liza
Decano (e)
Facultad de Medicina

ANEXO N°02



"AÑO DEL DIÁLOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL"
"DECENIO DE LA IGUALDAD DE OPORTUNIDADES PARA MUJERES Y HOMBRES"

Chiclayo, 11 de Abril del 2018

Señor
Jorge Luis Del Rosario Chavarry
Coordinador del Laboratorio de la Biotecnología e Ingeniería Genética
Universidad Nacional de Trujillo
Presente.-

Es grato dirigirme a Ud. y así mismo presentar a los estudiantes de la escuela de Odontología de la USAT, SAMANTHA MARTINEZ OROSCO identificados con DNI 70411336 y SOLANGE CONSUELO MENDOZA RODRIGO con DNI 73150319 , quienes se encuentran realizando el proyecto de investigación, "INFLUENCIA DE LA DENTINA EN EL EFECTO ANTIBACTERIANO DE 4 CONCENTRACIONES DE HIPOCLORITO DE SODIO EN EL CRECIMIENTO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ATCC 29212", para ello necesitan hacer su prueba piloto.

Por tal motivo, solicito a su despacho, pueda brindar las facilidades del caso a fin de poder efectuar la prueba piloto de dicho trabajo en la institución que dignamente dirige asimismo le solicito coordinar con las estudiantes las fechas y requerimientos respectivos .

Para ello adjunto la carta de aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina.

Agradezco por anticipado su gentil apoyo y comprensión ante lo solicitado, me despido no sin antes manifestarle mi consideración y estima personal.

Atentamente,



Mgr. Esp. CD. Maria Elizabeth Cruz Flores
Directora Escuela de Odontología



DIRECCION DE ESCUELA
ODONTOLÓGICA

ANEXO N° 03

Constancia de donación de piezas dentales de humanos con fines de estudio y/o investigación

Por intermedio de la presente, Yo C.D. Elmer Mara La Torre, identificado con DNI N° Registro del Colegio Odontológico del Perú 4727....., filial Lambayeque, y que actualmente ocupo el cargo de jefe del departamento de Odontología y Ortodoncia en la Clínica/Hospital Hosp. Reg. Dep. "Las Mercedes"; dejo constancia que he donado con fines de estudio y/o investigación, piezas dentales de humanos a la alumna/practicante Solange Consuelo Mendoza Rodrigo, de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo de Chiclayo, y cuya relación se adjunta en el siguiente cuadro:

Descripción	Cantidad (unidad)	Observaciones
<u>Piezas dentales de Humanos</u>	<u>12</u>	<u>Premolares</u>

Por lo cual, firmo la presente constancia.

Chiclayo, 11 de mayo de 2018

Oficinal Regional de Salud
Hosp. Reg. Dep. "Las Mercedes"-Ch.

Elmer Mara La Torre
CIRUJANO DENTISTA
Dpto. Odontología y Ortodoncia
COP. 4727

Firma y sello del médico donante.

[Firma]
UNIVERSIDAD CATOLICA SANTO TORIBIO DE MOGROVEJO
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA

ANEXO N° 04

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS N° 01

DATOS

Cepa *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212

10''	Control negativo (agua destilada + E.F ATCC 29212)	Hipoclorito de Sodio al 2.5% sin dentina					% de muerte = $(R_1/C_1) \times 100$					Promedio de % de muerte
		# de repeticiones					# de repeticiones					
	# de repeticiones	R1	R2	R3	R4	R5	%1	%2	%3	%4	%5	X1
	C1 C2 C3 C4 C5	Hipoclorito de Sodio al 5% sin dentina					% de muerte					X ₂
		# de repeticiones					# de repeticiones					
		R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	
	Control negativo (agua destilada + dentina+ E.F ATCC 29212)	Hipoclorito de Sodio al 2.5 % con dentina					% de muerte					
	# de repeticiones	# de repeticiones					# de repeticiones					
	C1 C2 C3 C4 C5	R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	X ₃
		Hipoclorito de Sodio al 5% con dentina					% de muerte					X ₄
		# de repeticiones					# de repeticiones					
		R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	

ANEXO N° 04

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS N° 02

DATOS

Cepa *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212

30''	Control negativo (agua destilada + E.F ATCC 29212)	Hipoclorito de Sodio al 2.5% sin dentina					% de muerte = (R₁/C₁)x 100					Promedio de % de muerte
		# de repeticiones					# de repeticiones					
	# de repeticiones	R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	X ₁
	C1 C2 C3 C4 C5	Hipoclorito de Sodio al 5% sin dentina					% de muerte					X ₂
		# de repeticiones					# de repeticiones					
		R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	
	Control negativo (agua destilada + dentina+ E.F ATCC 29212)	Hipoclorito de Sodio al 2.5 % con dentina					% de muerte					
		# de repeticiones					# de repeticiones					
	C1 C2 C3 C4 C5	R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	X ₃
		Hipoclorito de Sodio al 5% con dentina					% de muerte					X ₄
		# de repeticiones					# de repeticiones					
		R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	

ANEXO N° 04

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS N° 03

DATOS

Cepa *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212

60"	Control negativo (agua destilada + E.F ATCC 29212)	Hipoclorito de Sodio al 2.5% sin dentina					% de muerte = $(R_1/C_1) \times 100$					Promedio de % de muerte
		# de repeticiones					# de repeticiones					
	# de repeticiones	R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	X ₁
	C1 C2 C3 C4 C5	Hipoclorito de Sodio al 5% sin dentina					% de muerte					X ₂
		# de repeticiones					# de repeticiones					
		R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	
	Control negativo (agua destilada + dentina+ E.F ATCC 29212)	Hipoclorito de Sodio al 2.5 % con dentina					% de muerte					
		# de repeticiones					# de repeticiones					
	# de repeticiones	R1	R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅	X ₃
	C1 C2 C3 C4 C5	Hipoclorito de Sodio al 5% con dentina					% de muerte					X ₄
		# de repeticiones					# de repeticiones					
R1		R2	R3	R4	R5	% ₁	% ₂	% ₃	% ₄	% ₅		

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS N° 04

	Sin dentina		Con dentina	
	Hipoclorito de Sodio al 2.5%	Hipoclorito de Sodio al 5%	Hipoclorito de Sodio al 2.5%	Hipoclorito de Sodio al 5%
10''				
30''				
60''				