



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE ESTUDIOS DE POSGRADO E**  
**INVESTIGACIÓN**

**ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

**TESIS**

**“EFECTO DE IRRIGANTES EMPLEADOS EN ENDODONCIA SOBRE LA VIABILIDAD**  
**DE CÉLULAS PROGENITORAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL”**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

**PRESENTA**

**C.D. LILIANA SALTO MALDONADO**

ASESOR DE TESIS: Dra. En ciencias odontológicas: Deyanira Serrato Ochoa

COASESOR DE TESIS: Dr. En ciencias odontológicas: Renato Nieto Aguilar

MORELIA, MICHOACÁN

SEPTIEMBRE 2013

**EFECTO DE IRRIGANTES EMPLEADOS EN ENDODONCIA  
SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS PROGENITORAS DEL  
LIGAMENTO PERIODONTAL**

## DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a **DIOS**; Que me ha heredado el tesoro más valioso  
dándome una gran familia, que me ha llenado de valores y amor.

A mis padres quienes sin escatimar esfuerzo alguno sacrificaron gran parte de su  
vida para educarme.

A mi hermanita Imelda, por su gran amor, por sus innumerables consejos de vida  
y valiosa compañía en momentos críticos de mi vida.

A mi tía, Rosa, por su gran apoyo durante mi formación profesional.

A mi novio Aarón Jonatán Garibay por devolverme la confianza y la esperanza de  
una vida llena de alegría, paz y amor.

## AGRADECIMIENTO

No existirá forma alguna de agradecerles por su tiempo y paciencia. Quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes, que fueron la fuerza que me ayudó a conseguirlo.

De manera muy especial para mi asesor de tesis: Dra. Deyanira Serrato Ochoa, por su orientación, en el seguimiento y la supervisión continúa del presente trabajo, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de este tiempo.

También quiero darle las gracias a mi Coasesor de tesis: Dr. Renato Nieto Aguilar, que en conjunto con el Dr. Miguel Tapia, hicieron posible este gran sueño, reciban mi respeto y admiración siempre.

A mis maestros; todos y cada uno de ellos, que han sido la piedra angular, base firme de conocimientos, en especial a la Dra. Adriana Lucía Arenas Pérez, Dr. Martin Alberto Loeza Ramírez, Dr. Fernando Fernández, grandes gigantes de la endodoncia.

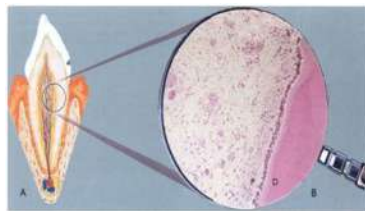
## ÍNDICE

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS .....      | 6  |
| GLOSARIO .....                          | 11 |
| RESÚMEN .....                           | 14 |
| PALABRAS CLAVES .....                   | 15 |
| INTRODUCCIÓN .....                      | 16 |
| ANTECEDENTES.....                       | 18 |
| JUSTIFICACIÓN.....                      | 65 |
| OBJETIVO GENERAL .....                  | 66 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....             | 67 |
| HIPÓTESIS.....                          | 68 |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....              | 69 |
| RESULTADOS.....                         | 71 |
| ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....               | 74 |
| CONCLUSIONES .....                      | 78 |
| RECOMENDACIONES .....                   | 80 |
| SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS ..... | 81 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....        | 82 |

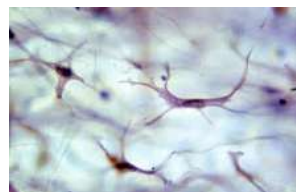
## RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS



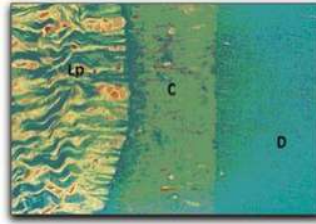
**FIGURA 1.** Estructura anatómica externa de un incisivo central superior y de un primer molar superior, muestra en ellas la corona, cuello y raíz.



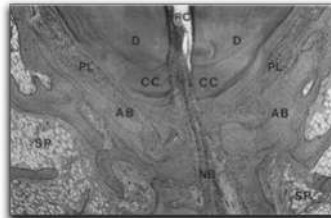
**FIGURA 2.** A) Esquema de un canino inferior, en el que es posible observar, la relación de la pulpa con la dentina que la circunda, y con los tejidos periapicales a través del foramen apical. B). microfotografía del complejo dentinopulpar, dentina D) pulpa P) (Soares, *et. al.*, 2003).



**FIGURA 3.** Microfotografía de fibroblastos pulpaes (Camelo M, 2011).



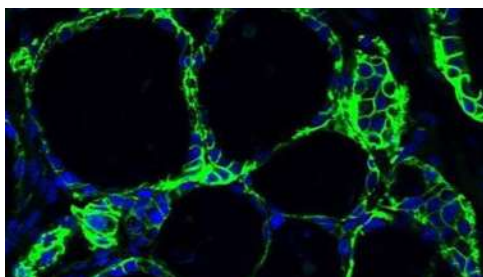
**FIGURA 4.** Cemento radicular. Imagen histológica del ligamento periodontal, cemento y dentina. Lp: Ligamento periodontal. C: Cemento radicular. D: Dentina (Soares, 2002).



**FIGURA 5.** Tejidos periapicales. Microfotografía que muestra los diferentes tejidos periapicales sanos. D: dentina, CC: cemento celular, PL: ligamento periodontal, NB: paquete vasculonervioso, SP: hueso esponjoso, AB: hueso alveolar, RC: conducto radicular (Nair, 2000).



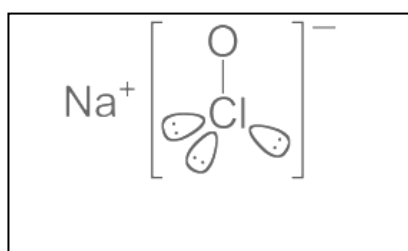
**FIGURA 6.** Ligamento periodontal. Micrografía de la luz de ligamento periodontal humano. Mostrando la red de fibras colágenas que se interpone entre el cemento radicular (C) y la pared del surco periodontal (B) (Beertsen, 1997).



**FIGURA 7.** Microfotografía de las células madre o progenitoras del ligamento periodontal (PDLSCs), observadas mediante inmunofluorescencia indirecta (Nieto *et. al.*, 2010).

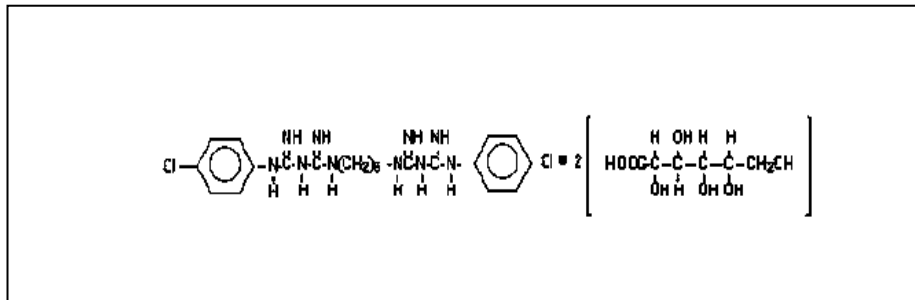


**FIGURA 8.** Terapéutica endodóntica (Salto M, 2012).



**FIGURA 9.** El hipoclorito de sodio existe en forma de sal pentahidratada  $\text{NaClO} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  y con 2,5 moléculas de agua de hidratación por molécula:  $\text{NaOCl} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$  (Berthollet, 1785).





**FIGURA 10.** Molécula de gluconato de clorhexidina (Polaco C, 2011).



**FIGURA 11.** El agua ozonizada a demostrado ser un agente que aumenta la oxigenación local suprimiendo e inhibiendo la proliferación bacteriana (Martínez A, 1990).



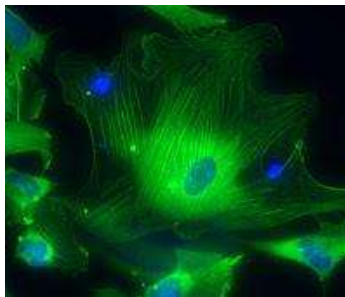
**FIGURA 12.** Aparato generador de Ozono por descarga en corona.



**FIGURA 13.** Generador de Ozono Primo LOGO3 por plasma.



**FIGURA 14.** El agua alcalina antioxidante, purifica nuestro organismo y nuestra sangre, eliminando los desechos, residuos y toxinas.



**FIGURA 15.** Microfotografía de las células Progenitoras del ligamento periodontal (PDLSCs), observadas mediante inmunofluorescencia indirecta (Nieto *et. al.*, 2010).

## GLOSARIO

### **ENDODONCIA:**

La endodoncia, como conjunto de conocimientos metódicamente formado y ordenado, constituye una ciencia, integrada en las ciencias de la salud. Su objetivo comprende el estudio de la estructura, morfología, fisiología, patología de la pulpa dental, y de los tejidos perirradiculares ([Canalda et. al., 2001](#)).

### **ENDODONCIA REGENERATIVA:**

Es el nuevo campo de la endodoncia que consiste en la regeneración de la estructura dental y la revitalización de los dientes ([Murray et. al., 2004](#)).

### **IRRIGACIÓN:**

Lavado y aspiración de todos los restos y sustancias que pueden estar contenidos en la cámara pulpar o conductos radiculares siendo uno de los procedimientos más importantes durante la terapia endodóntica ([Lasala, 1993](#)).

### **HIPOCLORITO DE SODIO:**

Es un líquido claro, pálido, verde amarillento, extremadamente alcalino y con fuerte olor clorino, que presenta una acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos y además es un potente agente antimicrobiano ([Mhera, 2000](#)).

### **CLORHEXIDINA:**

La clorhexidina, pertenece al grupo de antisépticos bisbiguanídicos, de una molécula simétrica, compuesta de dos anillos clorofenólicos y dos grupos de biguanida conectados por un puente central de hexametileno. Es una base fuerte y dicatiónica con niveles de pH > 3.5, con dos cargas más a cada extremo ([Schiott, 1970](#)).

### **EL AGUA OZONIFICADA:**

El ozono es la forma alotrópica del oxígeno, ésta se forma cuando dos átomos del oxígeno estable, son excitados y se convierten en tres átomos de oxígeno activo e inestable, con un poder germicida de amplio espectro, capaz de eliminar y destruir bacterias, virus, hongos y esporas ([Kuchel et. al., 1997](#)).

### **AGUA ALCALINA:**

Es una sustancia inodora, incolora, transparente, con ligero sabor salino. El potencial del hidrógeno (pH) fluctúa de 9 a 11, esto denota su gran alcalinidad. Su capacidad antioxidante se comprueba por su elevada carga eléctrica negativa desde -100 hasta -900 milivoltios.

### **LAS CÉLULAS PROGENITORAS:**

Se han definido como células clono génicas, con un amplio potencial de auto renovación (definida como la capacidad de generar al menos una célula hija con características similares a la célula de origen, manteniéndose al mismo tiempo en un estado indiferenciado), así como la elevada capacidad de proliferación (dividirse sin cambiar su fenotipo celular indiferenciado) y su potencial de diferenciación (potencial para modificar el

fenotipo de la célula de origen en distintos tipos celulares, diferentes al tejido embrionario, originando diversas líneas celulares como medula ósea, sangre periférica, cerebro, piel, pulpa dental y ligamento periodontal, entre otros) ([Fuchs et. al., 2002](#)).

## RESÚMEN

El éxito del tratamiento endodóntico, está directamente influenciado por la eliminación de los microorganismos en los conductos radiculares, esto se logra utilizando agentes antimicrobianos como irrigantes, medicación intraconducto y un sistema de obturación adecuado. El hipoclorito de sodio, y la clorhexidina son materiales empleados frecuentemente como medios de irrigación de los conductos radiculares.

A través de diversas revisiones en revistas científicas, fuentes bibliográficas como libros y fuentes electrónicas, se pretende encontrar la metodología más adecuada, para conocer el posible daño en las células progenitoras del ligamento periodontal (PDLSCs), cuando de manera accidental este irrigante se extruye a los tejidos periapicales.

Esta revisión contempló también, un análisis relacionado con la citotoxicidad generada en componentes celulares en contacto con las soluciones de irrigación sugeridas.

Con todo esto, se intenta comprobar que la viabilidad de las PDLSCs, y que no se vean afectadas con el empleo de agua ozonizada y agua alcalina, en relación con la clorhexidina e hipoclorito de sodio.

## **PALABRAS CLAVES**

Irrigantes en endodoncia, viabilidad celular, células del ligamento periodontal (PDLSCs).

## INTRODUCCIÓN

El objetivo más importante del tratamiento endodóntico, es reducir al mínimo el número de microorganismos y residuos patógenos en el sistema de conductos, para prevenir o tratar una periodontitis apical.

El éxito del tratamiento endodóntico está directamente influenciado por la eliminación de los microorganismos en los conductos infectados, esto se logra con agentes antimicrobianos como soluciones irrigantes, medicamentos intraconducto y sistemas de obturación adecuado.

Enfocaremos nuestra atención al proceso de irrigación, el cual se define como un lavado y aspiración de todos los restos y sustancias, que pueden estar contenidos en la cámara pulpar y conductos radiculares, siendo este procedimiento de los más importantes durante la terapia endodóntica ([Lasala, 1992](#)).

El hipoclorito de sodio, y la clorhexidina son materiales empleados frecuentemente como medios de irrigación de los conductos radiculares.

Se establecerá, la metodología más eficaz, para conocer el grado de daño ocasionado en las PDLSCs, cuando estas soluciones irrigantes, a diferentes concentraciones, son extruidas en los tejidos periodontales.

El hipoclorito de sodio, posee, una acción antimicrobiana, puesto que inhibe las enzimas esenciales de las bacterias por medio de oxidación.



La acción bactericida y de disolución del hipoclorito de sodio, pueden ser modificadas por tres factores: concentración, temperatura y PH de la solución, sin embargo al aumentar la concentración, aumenta la eficacia y por tanto, la citotoxicidad.

La extrusión del hipoclorito de sodio más allá del ápice, ocasiona ciertas complicaciones, destacando: la necrosis de los tejidos, la inflamación tisular, reabsorción externa, equimosis, presencia de hematomas tisulares, sangrado intersticial, complicaciones neurológicas, entre otras. Por consiguiente, los cambios que se suscitan en el espacio pulpar impactan directamente a los tejidos apicales.

No existe una solución irrigadora ideal, se deberán combinar dos o más para conseguir el éxito del tratamiento, ya que ninguna de las soluciones irrigantes disponibles actualmente, cumple con los requisitos de ser altamente eficaz.

De acuerdo a lo anteriormente citado, se pretende exponer, la mejor metodología para estudiar el posible reemplazo del hipoclorito de sodio y la clorhexidina (ampliamente utilizados, como soluciones irrigantes, en tratamientos de conductos radiculares).

## ANTECEDENTES

### GENERALIDADES DEL DIENTE

El vocablo diente, es el nombre genérico que designa a la unidad anatómica de la dentadura, sea cual fuere la posición que guarda en las arcadas. Para identificar cada pieza dentaria en particular, se agrega un adjetivo, que especifica su función correspondiente.

Así se tiene: diente incisivo, diente canino, diente premolar y diente molar ([Esponda, 1994](#)). Los dientes son formaciones ectodérmicas duras, resistentes, implantadas por sus raíces en los alvéolos de la maxila y de la mandíbula, destinados a dividir los alimentos sólidos para constituir el bolo alimenticio ([Latarjet et. al., 1997](#)).

### DESCRIPCIÓN GENERAL Y CONSTITUCIÓN ANATÓMICA

#### ASPECTO EXTERIOR

Todos los dientes se componen estructuralmente por: corona, cuello y raíz.

#### CORONA

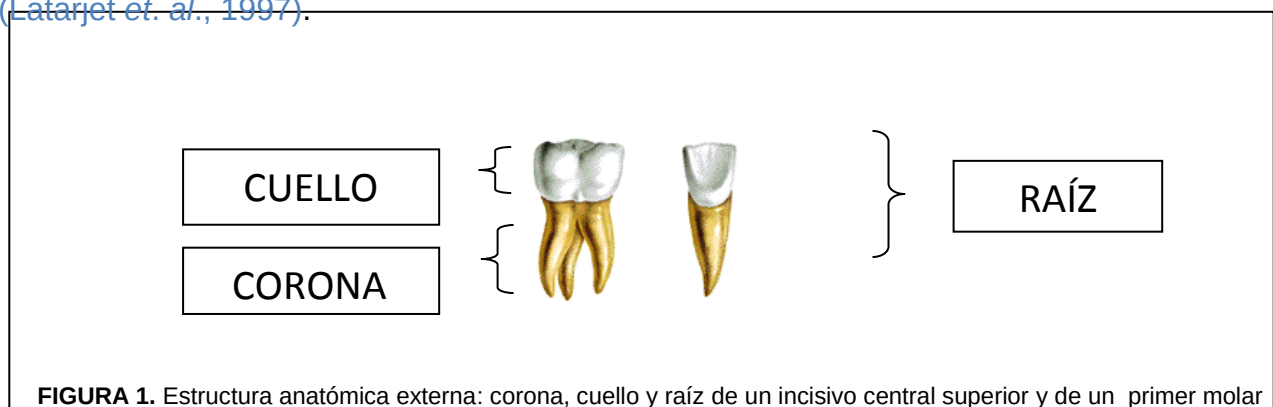
Se encuentra cubierta por el esmalte. La corona tiene una forma cuboidea. En las superficies de las distintas caras de la corona forman eminencias, depresiones y surcos. En los incisivos y caninos, la corona tiene cinco caras y bordes cortantes, los cuales reciben sus nombres de acuerdo a la ubicación (Figura 1).

#### CUELLO

Parte intermedia entre la corona y la raíz donde se fija la encía (Figura 1) ([Latarjet et. al., 1997](#)).

## RAÍZ

Esta puede ser única o múltiple, de forma cónica, color amarillento, superficie rugosa, se hunde en los alveolos dentarios. La raíz es la parte del diente cubierta por cemento y alojada en los alvéolos. En general de forma cónica, se distinguen una base, cuerpo, vértice o ápice. La raíz es habitualmente algo más larga que la corona, su volumen es variable. Pueden presentar surcos o elevaciones extendidas o prominencias (Figura 1) ([Latarjet et. al., 1997](#)).



**FIGURA 1.** Estructura anatómica externa: corona, cuello y raíz de un incisivo central superior y de un primer molar

superior ([Salto M, 2012](#)).

## ESTRUCTURA DEL TEJIDO DENTARIO

Los dientes están formados por cuatro clases de tejidos. Tres de estos tejidos son duros, mineralizados, y constituyen la cubierta del cuarto tejido, llamado pulpa. Este es un tejido blando cuya función y aspecto, da características de ser la expresión más real de la vitalidad. Está situado dentro del diente en la porción central y en una cavidad, la cual recibe el nombre de cámara pulpar. Los tres tejidos mineralizados del diente son, por

orden decreciente de dureza: esmalte, dentina y cemento. Cada uno de éstos es más duro que el tejido óseo ([Esponda, 1994](#)).

## ESMALTE

El esmalte o sustancia adamantina, es una matriz extracelular altamente mineralizada y de escaso metabolismo, que se forma por síntesis y secreción de unas células llamadas ameloblastos, que desaparecen cuando el diente hace erupción en la cavidad bucal. El esmalte consta de un 95% de materia inorgánica y está constituido fundamentalmente por cristales de hidroxiapatita ([Gómez de Ferraris et. al., 2008](#)).

## DENTINA

La dentina consiste, en una matriz orgánica mineralizada, dominadas por un esqueleto colágeno entramado por túbulillos dentinarios, contiene numerosos polipéptidos y moléculas señalizadoras colocadas en una matriz mineralizada ([Andreasen et. al., 2010](#)). Compuesta por un 70% de cristales inorgánicos de hidroxiapatita, y un 20% de fibras de colágena, también contiene proteínas, así como un 10% de agua.

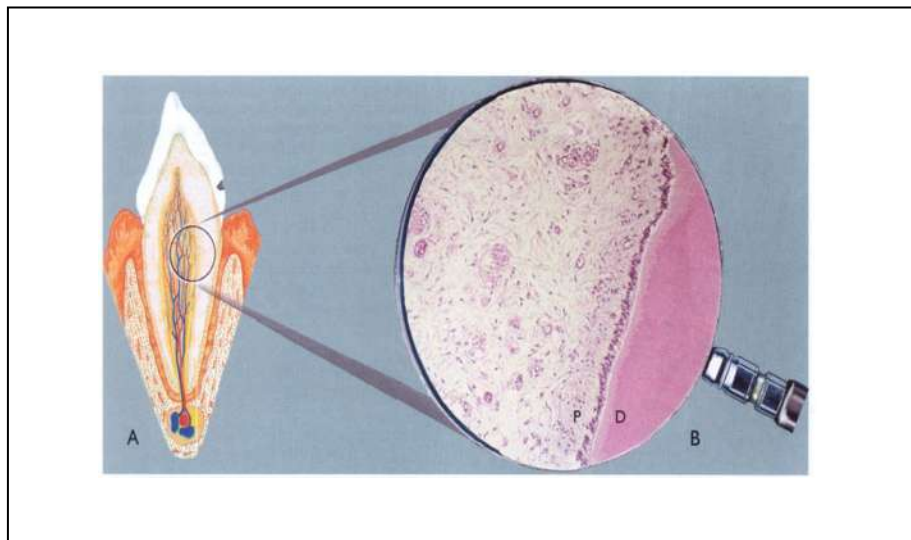
Puede ser clasificada como primaria, secundaria o terciaria, según el tiempo de desarrollo y de las características histológicas del tejido ([Estrela, 2002](#)). La dentina primaria está compuesta por la dentina del manto y por la dentina circumpulpar, que se deposita hasta el momento en que el órgano dentario finaliza su erupción y entra en contacto con su antagonista.

## PULPA

La pulpa dentaria puede ser definida como un tejido conjuntivo laxo especializado, de origen mesenquimático, circundado por paredes de dentina, ocupa la cámara pulpar y los conductos radiculares (Figura 2). La pulpa está formada por un 75% de agua y un 25% de material orgánico. Éste último, está constituido por células y una matriz extracelular representada por células o sustancia fundamental ([Soares et. al., 2002](#)).

La especialización del tejido conjuntivo de la pulpa, se debe a las células dispuestas en su periferia: los odontoblastos, responsables de la formación de la matriz orgánica de la dentina, que se mineraliza y recubre la pulpa. Esta relación de interdependencia entre dentina y pulpa hace de este tejido un complejo dentino-pulpar ([Estrela, 2002](#)).

Las células predominantes en la pulpa son los fibroblastos, los cuales aparecen como células ahusadas o estrelladas con núcleos ovalados y están dispersos uniformemente, excepto en la capa subodontoblástica ([Andreasen et. al., 2010](#)).



**FIGURA 2.** A) Esquema de un canino inferior, en el que es posible observar la relación de la pulpa con la dentina que la circunda y con los tejidos periapicales a través del foramen apical. B) microfotografía del complejo dentina D) pulpa P).

(Soares *et. al.*, 2002).

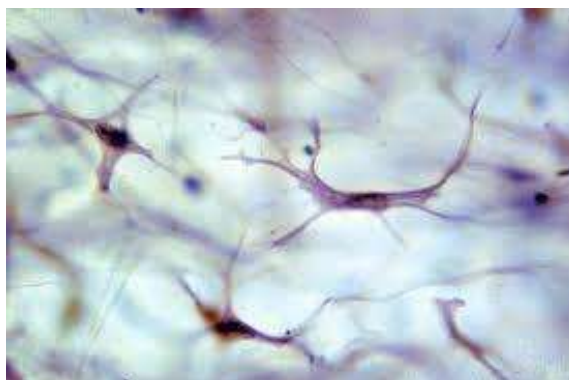
## POBLACIONES CELULARES DE LA PULPA NORMAL

En la pulpa existe una población celular muy heterogénea, que varía en densidad, según las distintas zonas de la misma, tales como odontoblastos, células mesenquimáticas indiferenciadas y fibroblastos, entre otros.

### FIBROBLASTOS

Estas células presentan un contorno fusiforme, con gran desarrollo de las organelas que intervienen en la síntesis proteica (Figura 3). El núcleo generalmente es elíptico y exhibe uno o dos nucléolos.

Son las células, más abundantes del tejido conectivo pulpar, especialmente, en la corona, donde forman la capa denominada rica en células. Los fibroblastos secretan los precursores de las fibras colágenas reticulares y elásticas, así como la sustancia fundamental de la pulpa (Gómez de Ferraris *et. al.*, 2008).



**FIGURA 3.** Microfotografía de fibroblastos pulpaes ([Camelo M, 2011](#)).

### **CÉLULAS MESENQUIMÁTOSAS INDIFERENCIADAS DEL ÓRGANO PULPAR**

Generalmente, se ubican en la región subodontoblástica o en la proximidad de los capilares sanguíneos, por lo que, suelen denominarse células perivasculares o pericitos. Esta variedad celular está estrechamente vinculada a la microvasculación pulpar.

Las células mesenquimáticas indiferenciadas del periápice, son las que pueden dar lugar a las distintas líneas celulares: fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos y ocasionalmente odontoblastos, como respuesta biológica ante determinadas situaciones clínicas. Este tejido especializado periapical, se diferencia del conectivo periodontal, por una gran capacidad de regeneración celular ([Gómez de Ferraris et. al., 2008](#)). Recientemente se han identificado células madre o progenitoras de la pulpa dental, las cuales han sido aisladas de la pulpa dental postnatal. Las células expresan varios marcadores relacionados con el endotelio y el musculo liso, como VCAM- 1 molécula de adhesión celular vascular- CD146 y actina  $\alpha$  de musculo liso. En la actualidad se están investigando nuevos marcadores

útiles para identificar las células madre *in situ*, para su aislamiento y su purificación *ex vivo* (Gómez de Ferraris *et. al.*, 2008).

## ANATOMÍA DEL PERIODONTO

El periodonto, es el conjunto de estructuras tisulares que protegen y soportan los dientes. Está formado básicamente por la encía, el cemento radicular, el hueso alveolar y el ligamento periodontal (Figura 5) (Lindhe *et. al.*, 2005). Estos tejidos conforman la unidad de desarrollo, biológico y funcional, conocida como periodonto de inserción, la cual experimenta cambios morfológicos relacionados con la edad, con alteraciones funcionales y con el medio bucal. La función principal del periodonto, consiste en unir y mantener el diente al tejido óseo de los maxilares (Soares *et. al.*, 2002; Lindhe *et. al.*, 2005; Carranza *et. al.*, 2004). El periodonto de inserción, forma una unidad funcional y evolutiva durante las diferentes etapas de la vida. Su formación, se procede simultáneamente a la formación de los dientes a partir de las células mesenquimáticas del primer arco branquial, procedente de la cresta neural (Lindhe *et. al.*, 2005).

## ENCÍA

Es la mucosa bucal, que protege y cubre por continuidad los procesos alveolares, donde están insertados los dientes. Su disposición firme y festoneada alrededor de las coronas dentarias, es consecuencia del soporte del tejido fibroso conectivo y el hueso que lo compone. Se pueden distinguir 3 partes: (Lindhe *et. al.*, 2005).

- a) Margen gingival o encía libre marginal
- b) Encía adherida o insertada



c) Encía interdental

Se componen de un epitelio, con diferentes características según la zona anatómica, y de un tejido conectivo ([Lindhe et. al., 2005](#)).

Se distinguen tres epitelios:

1. Epitelio gingival que se continúa con el epitelio oral
2. Epitelio del surco gingival
3. Epitelio de unión o adherencia epitelial

## CEMENTO RADÍCULAR

Es una capa calcificada, que cubre la totalidad de la superficie de la dentina radicular. Su origen embriológico, se encuentra en la capa que reviste el folículo dental, por su dureza, se asemeja al hueso, pero no contiene vasos sanguíneos ni una inervación. Su grosor no es uniforme. Su formación es continua e indefinida, con una capa no calcificada o precemento, el cual contiene fibras de Sharpey.

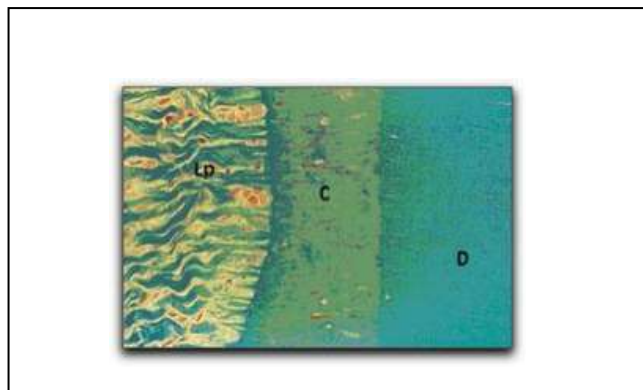
Su función principal es el soporte del diente y la participación en la reparación de lesiones (Figura 4) ([Soares, 2002](#)).

Se distinguen 2 tipos de cemento: ([Berkovitz et. al., 1977](#)).

**Acelular o primario:** formado antes de la erupción completa del diente. Se localiza en los dos tercios cervicales del diente y no contiene células.

**Celular o secundario:** se forma posteriormente, más irregular y situado en el área más apical del diente. Presenta células en lagunas, denominados cementocitos, que están intercomunicadas.

Las fibras colágenas que se observan, son las fibras de Sharpey (fibras extrínsecas), que corresponden a la inserción de las fibras del ligamento periodontal en el cemento y que son sintetizadas por los fibroblastos periodontales y fibras colágenas intrínsecas en la matriz del cemento y que a su vez son sintetizadas por los cementoblastos que también producen la sustancia fundamental a base de glicoproteínas.



**FIGURA 4.** Cemento radicular. Imagen histológica del ligamento periodontal, cemento y dentina. Lp: Ligamento periodontal. C: Cemento radicular. D: Dentina (Soares, 2002).

## CARACTERÍSTICAS DEL CEMENTO RADÍCLAR

De menor dureza que la dentina y una permeabilidad que disminuye con la edad. El cemento celular, es más permeable, pero debido al menor grosor cervical y con la frecuencia de recesión gingival, se produce una eliminación de éste, a consecuencia de la abrasión ocasionada al exponerse la raíz al medio oral, quedando expuesta la dentina, al ambiente directo de la boca. Existe en su composición, una gran presencia de sustancia inorgánica en cuanto a peso y volumen al compararla con la sustancia orgánica. Hay zonas calcificadas en forma de hidroxiapatita, que varían según el punto que se considere. La sustancia orgánica presenta, colágeno tipo I. El límite del cemento, con el esmalte a nivel cervical en la línea amelocementaria, es variable ([Lindhe et. al., 2005](#)).

## HUESO ALVEOLAR

El hueso alveolar, está constituido por el hueso alveolar propiamente dicho y por el hueso de soporte. El hueso alveolar, es una delgada capa de hueso compacto, que recubre al alvéolo llamado también lámina dura, es producido por los osteoblastos del ligamento periodontal y es un tejido especializado, que experimenta remodelaciones por resorción y aposición ósea durante toda la vida. El hueso de soporte que circunda y sustenta al hueso alveolar del alveolo dental, está constituido por las placas corticales vestibular y lingual de hueso compacto y por el correspondiente tejido óseo esponjoso o trabecular.

La irrigación sanguínea del hueso alveolar, proviene de numerosas anastomosis existentes entre las distintas arterias y conforman la unidad funcional que irriga los tejidos

duros y blandos de los maxilares (Soares *et. al.*, 2002; Lindhe *et. al.*, 2005; Smulson *et. al.*, 1997).

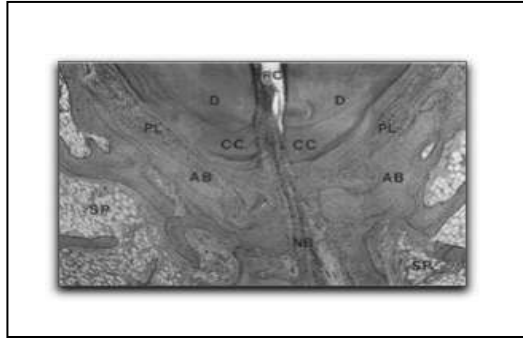


FIGURA 5. Tejidos periapicales. Microfotografía que muestra los diferentes tejidos periapicales sanos. D: dentina, CC: cemento celular, PL: ligamento periodontal, NB: paquete vasculonervioso, SP: hueso esponjoso, AB: hueso alveolar, RC: conducto radicular (Nair, 2000).

## LIGAMENTO PERIODONTAL

Está formado por fibras conectivas, que unen la raíz dentaria al hueso alveolar para fijar el diente al hueso y amortiguar las fuerzas que actúan sobre la corona (Figura 6). En la proximidad del hueso alveolar y del cemento radicular, se encuentran estructuras denominadas fibras de Sharpey, que se entrecruzan en el centro del espacio periodontal (Soares *et. al.*, 2002).



FIGURA 6. Ligamento periodontal. Micrografía de luz de ligamento periodontal humano. Mostrando la red de fibras colágenas que se interpone entre el cemento radicular (C) y la pared del surco periodontal (B) ([Beertsen, 1997](#)).

Se distinguen diferentes grupos de fibras: ([Soares et. al., 2002](#)):

1. Fibras principales de colágeno (Figura 6).
  - a) Fibras crestales o supracrestales: unen el cemento a la cresta alveolar y se sitúan por debajo del epitelio de unión.
  - b) Fibras horizontales, las cuales se extienden desde el hueso alveolar hasta el cemento.
  - c) Fibras oblicuas, las más numerosas, unen también el hueso alveolar y el cemento radicular.
  - d) Fibras apicales que van, desde el cemento al fondo del alveolo.
2. Las fibras secundarias, agrupan fibras de colágeno, que completan los haces fibrosos, fibras de elastina y de oxitalán.

Estas últimas se distinguen paralelas al eje axial al diente. Todo este conjunto fibroso, deja una malla densa de colágeno con unas funciones específicas:

1. Mecánicas:
  - a) unión del diente al hueso

- b) transmisión de las fuerzas de oclusión al hueso
- c) amortiguación y resistencia de estas fuerzas
- d) protección de las estructuras vásculo-nerviosas

2. Formativas:

Permite la posición del diente mediante la erupción, sostén, y movimiento. Existe una remodelación continua, entre procesos de resorción y formación.

3. Reparación:

Capacidad de reparación del hueso alveolar y del cemento.

4. Nutritiva y sensorial:

Aporte de nutrientes por la vascularización al hueso alveolar, al cemento y a la encía. La inervación por los mecano-receptores, mantienen una sensibilidad propioceptiva y táctil de autocontrol de la masticación, por un mecanismo neuromuscular ([Soares et. al., 2002](#)).

## VASCULARIZACIÓN E INERVACIÓN DEL LIGAMENTO PERIODONTAL

La red vascular, procede de las arterias alveolares superior e inferior correspondientes, que forman un plexo vascular; también participan vasos gingivales, a través, del periostio, que son ramas de las arterias lingual y palatina. Otra vía distinta, es a través, de las paredes alveolares por arterias de los septos alveolares.

Las venas no acompañan a las arterias. Estas penetran en las paredes alveolares, formando una red intraalveolar con anastomosis de venas gingivales ([Berkovitz et. al.,](#)

1977). La inervación, es rica en fibras nerviosas sensitivas, que transmiten estímulos de presión, tacto y dolor. Estas aferencias, se conducen por ramificaciones periodontales, hacia el nervio dentario, así como ramificaciones laterales, por la pared ósea al nervio intraalveolar. El tronco nervioso, es el trigémino que transfiere las sensaciones, hacia centros neurológicos superiores.

### **MATRIZ EXTRACELULAR DEL LIGAMENTO PERIODONTAL**

Su composición es similar a la encía, con 60% de haces de fibras de colágeno. Las funciones también son comunes: control de la síntesis y orientación de las fibras de colágeno y captación e intercambio de agua e iones: la diferencia principal, es que participa en el mecanismo de erupción del diente. Al parecer, la presión del líquido intercelular, actuaría como presión hidrostática de la vascularización, para la fuerza eruptiva del diente y para su capacidad de sostén. Según la función que realice a las circunstancias ambientales la composición de proteoglicanos puede variar. Aumenta de forma significativa el nivel de un proteoglicano híbrido, formado por condroitín sulfato y dermatán sulfato. Todos los componentes de la sustancia amorfa, también son secretadas en su mayoría, por los fibroblastos que ahí residen (Berkovitz *et. al.*, 1977).

### **ELEMENTOS CELULARES DEL LIGAMENTO PERIODONTAL**

Las células representativas son los fibroblastos. Estos al igual que los que se localizan en la encía, tienen una alta capacidad de síntesis y metabolismo proteico, con una diferencia en su estructura y relación: contactos intercelulares del tipo de desmosoma simple y la presencia de cilios que al parecer intervienen en el control del ciclo celular (Berkovitz *et. al.*, 1977).

Estas poblaciones celulares dan lugar a los elementos celulares, que se encuentran en las superficies del cemento y del hueso; cementoblastos, cementoclastos, osteoblastos y osteoclastos.

Todas ellas, proceden de un tronco celular común, aunque con funciones distintas de síntesis y degradación. También, se pueden observar acúmulos de células epiteliales que corresponden a los restos epiteliales de Malassez, los cuales son vestigios de la vaina radicular de Hertwig durante el desarrollo del diente.

Los fibroblastos del ligamento periodontal, presentan algunas diferencias con respecto a los cementoblastos: un retículo endoplásmico y aparato de Golgi más desarrollados, con mayor capacidad para sintetizar colágeno, menor densidad y volumen, en particular, de glucógeno en su citoplasma ([Yamasaki et. al., 1987](#)).

Se pueden observar también células transitorias, como los macrófagos, mastocitos y eosinófilos.

## **FIBROBLASTOS**

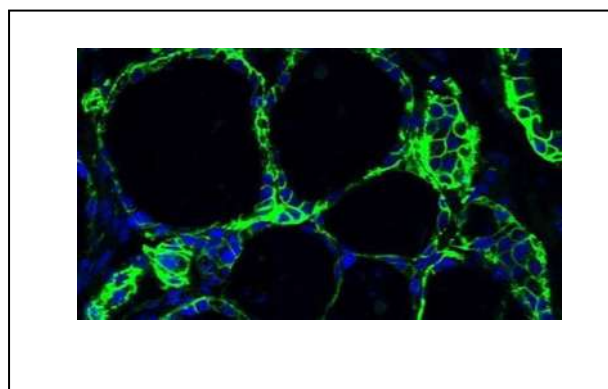
Son células pleomórficas. En el estado funcional de reposo, se le llama fibrocito. El citoplasma es escaso y a menudo difícil de identificar en secciones histológicas ordinarias. En la forma activa madura, la célula se vuelve fusiforme y es ahora llamada fibroblasto.

El rasgo más característico, es el ahora extenso desarrollo del retículo endoplasmático dilatado, siendo éste, el sitio de la síntesis de proteínas ([Gabbiani et. al., 1981](#)). Los



fibroblastos, tienen una atracción quimiotáctica para colágeno tipo I, II, III, así como también para péptidos derivados de colágeno, con vinculación de estos péptidos directamente a los fibroblastos ([Postlethwaite et. al., 1978](#)). Su función principal, es sintetizar y excretar los componentes principales del tejido conectivo; colágeno, elastina y proteoglicanos. El fibroblasto, también se ve involucrado, en la contracción de heridas a través de una célula específica, llamada miofibroblastos, la cual presenta características tanto de fibroblastos como de células de músculo liso.

Otro elemento importante del ligamento periodontal, son las células mesenquimáticas indiferenciadas del periápice también llamadas células progenitoras (Figura 7), precursoras, stem cell, células troncales, entre otras, las cuales, pueden dar lugar a las distintas líneas celulares: fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos y ocasionalmente odontoblastos, como respuesta biológica, ante determinadas situaciones clínicas. Este tejido especializado periapical, se diferencia del conectivo periodontal por una gran capacidad reaccional. Recientemente, se han identificado células madre o progenitoras en dicho tejido, las cuales juegan un papel muy importante en la regeneración tisular periapical ([Gómez de Ferraris et. al., 2008](#)).



**Figura 7.** Microfotografía de células madre o progenitoras del ligamento periodontal (PDLSCs) observadas mediante inmunofluorescencia (Nieto A, 2010).

## GENERALIDADES DE LA ENDODONCIA

La endodoncia, como conjunto de conocimientos metódicamente formado y ordenado, constituye una ciencia, integrada en las ciencias de la salud. Su objetivo comprende el estudio de la estructura, morfología, fisiología, patología de la pulpa dental, y de los tejidos perirradiculares (Canalda *et. al.*, 2001).

Integra las ciencias básicas y clínicas que se ocupan de biología de la pulpa, etiopatología, diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades y lesiones de los tejidos perirradiculares (Canalda *et. al.*, 2001).

El objetivo más importante de la terapéutica endodóntica: es reducir al mínimo, el número de microorganismos y residuos patógenos inmersos en el sistema de conductos, evitando así, una periodontitis apical (Grossman, 1970).

El tratamiento del conducto radicular (Figura 8); consiste en la eliminación completa de la pulpa que ha sufrido un daño irreversible y de todo el tejido remanente, limpieza, configuración y obturación del sistema del conducto radicular, de manera que se pueda conservar el diente como una unidad funcional dentro del arco dental. Con respecto a la preparación biomecánica, existe diversidad de opiniones y conceptos a lo largo del desarrollo de la endodoncia. El término biomecánica es introducido en endodoncia desde 1953, para designar el conjunto de intervenciones técnicas que preparan la cavidad pulpar para su posterior obturación (Basrani, 1999).



FIGURA 8. Terapéutica endodóntica (Salto M, 2013).

Se señala, que la piedra angular, del éxito en el tratamiento de conductos, está en el cumplimiento de la llamada tríada endodóntica, compuesta por tres principios básicos: asepsia, preparación biomecánica y sellado apical (Ingle *et. al.*, 1979).

Se denominó limpieza y conformación, a la eliminación de todo el sustrato orgánico del sistema de conductos radiculares, así como a la elaboración de una forma determinada dentro de cada conducto, para la recepción de una obturación hermética y tridimensional en todo el espacio de estos, destacando la necesidad del desbridamiento, que consiste en retirar del sistema de conductos radiculares, los irritantes existentes (Schilder, 1974).

Existe un gran número de investigaciones al respecto, que determinan las múltiples dificultades implícitas en la limpieza de estos pequeños y complejos espacios.

La limpieza y conformación de los conductos radiculares, está condicionada por el estado patológico de la pulpa y de los tejidos perirradiculares, pero sobre todo por la anatomía radicular (Schilder, 1974).

La fase de instrumentación del conducto radicular, siempre va acompañada de la irrigación. Esta fase del tratamiento endodóntico, es muy importante, ya que nos ayuda a eliminar los restos pulpaes producidos por la instrumentación, evitando de esta manera, la obstrucción de dichos conductos. También nos ayuda a la antisepsia del conducto en casos de conductos infectados.

Se han propuesto varias técnicas para facilitar la limpieza y conformación del sistema de conductos radiculares con irregularidades anatómicas. Algunas, preparan el conducto desde la porción coronaria y progresan hacia el ápice y otras lo inician desde este último y retroceden hacia la entrada del conducto. También, se ha propuesto la combinación de ambas técnicas ([Canalda et. al., 2001](#)).

## **IRRIGACIÓN**

Se define el proceso de irrigación, como un lavado y aspiración de todos los restos y sustancias que pueden estar contenidos en la cámara pulpar o conductos radiculares, siendo uno de los procedimientos más importantes durante la terapia endodóntica ([Lasala, 1993](#)).

**FINALIDADES DEL PROCESO DE IRRIGACIÓN** ([Leonardo, 1994](#)).

- Eliminar restos pulpares, viruta dentinaria y restos necróticos que pueden actuar como nichos de bacterias, los cuales pudieran desplazarse a la región periapical produciendo agudizaciones.
- Disminuir la flora bacteriana.
- Humedecer o lubricar las paredes dentinarias, facilitando la acción de los instrumentos.
- Eliminar la capa de desecho.
- Aumentar la energía superficial de las paredes del conducto, favoreciendo el contacto de los medicamentos usados y permitir la retención mecánica de los cementos obturados.

### **CARACTERÍSTICAS DEL IRRIGANTE IDEAL**

Las soluciones Irrigantes, empleadas en la práctica endodóntica deben poseer ciertas propiedades, para que ello de lugar al irrigante ideal ([Leonardo, 1994](#)):

- Solvente de tejidos o desechos
- Baja toxicidad
- Lubricantes
- Desinfección
- Eliminación de la capa de desecho

### **HIPOCLORITO DE SODIO**

El hipoclorito de sodio (Figura 9); es el compuesto halogenado, más popular, que se ha utilizado en endodoncia, como solución irrigante en el interior de los conductos radiculares, desde principios del siglo XX ([Serper, 2004](#)).

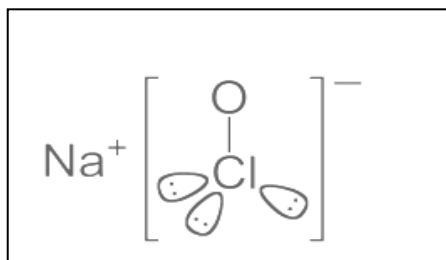


FIGURA 9. El hipoclorito de sodio existe en forma de sal pentahidratada  $\text{NaClO} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  y con 2,5 moléculas de agua de hidratación por molécula:  $\text{NaOCl} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ . La primera forma es la más conocida. A  $0^\circ\text{C}$  se disuelven 29,3 g de la sal en 100 g de agua y a  $23^\circ\text{C}$  ya son 94,2 g/100 (Berthollet, 1785).

## DEFINICIÓN

Líquido claro, pálido, verde amarillento, extremadamente alcalino y con fuerte olor clorino, que presenta una acción disolvente, sobre el tejido necrótico y restos orgánicos, además es un potente agente antimicrobiano.

Se caracteriza, por ser un potente agente antibacteriano y tener un gran poder citotóxico. Su principal función, es disolver los restos de tejido pulpar; es efectivo tanto en tejido vital, como en tejido necrótico (Mhera, 2000).

## PROPIEDADES DEL HIPOCLORITO DE SODIO

Las propiedades del hipoclorito de sodio son (Canalda, 2001):

1. Tensión superficial baja.

2. Neutraliza los productos tóxicos.
3. Acción antimicrobiana.
4. Favorece la instrumentación por su efecto humectante.
5. pH alcalino, alrededor de 12.
6. Deshidratación y solubilización de las sustancias proteicas.
7. Acción detergente.

### **MECANISMO DE ACCIÓN**

Las acciones del hipoclorito de sodio, operan mediante tres mecanismos ([Estrela et. al., 2002](#)).

- a) Saponificación, donde actúa como un solvente orgánico que degrada los ácidos grasos hacia sales ácidas grasas (jabón) y glicerol (alcohol); además reduce la tensión superficial de la solución remanente.
- b) Neutralización, donde el hipoclorito de sodio, neutraliza aminoácidos formando agua y sal.
- 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. La acción bactericida y de disolución, pueden ser modificadas por tres factores: concentración, temperatura y PH de la solución ([Estrela, 2002](#)).

### **COMPLICACIONES POR UN DERRAME**

- Daño en la ropa, es probablemente el más común. La decoloración de la ropa es irreparable ([Spencer et. al., 2007](#)).
- Daño ocular, el irrigante en contacto con los ojos del paciente o del operador, produce de forma inmediata dolor, intensa sensación de quemazón y eritema. Se puede producir, la pérdida de las células epiteliales de la capa exterior de la córnea ([Hulsmann et. al., 2003](#)).
- Daño cutáneo; se describieron casos de lesiones en la piel, por escape del hipoclorito, a través del margen del dique de goma. El paciente notificó sensación de quemazón con posterior aparición de erupción cutánea y, más tarde, costras en la zona del mentón ([Spencer et. al., 2007](#)).
- Daño en la mucosa oral; si el paciente traga hipoclorito debe ser monitorizado y el tratamiento debe ser urgente. Hauman y cols. 2003, estudiaron el efecto de la ingesta de 10 ml de NaOCl al 5, 25%, durante 5 minutos en perros, concluyendo que esto, ocasiona esofagitis caustica, motivo por el cual, estos investigadores sugieren que el tiempo de contacto con el hipoclorito en mucosas, debe ser el mínimo posible.

## ALERGIA AL HIPOCLORITO DE SODIO

Esta reacción es rara, pero es importante identificarla. Se presenta, generalmente, como urticaria, edema, dificultad de respiración, bronco espasmo e hipotensión ([Spencer et. al., 2007](#)).



Estos autores, describen dos casos en que gracias a una correcta anamnesis, se sospechó de una posible alergia al hipoclorito. Se realizaron pruebas cutáneas de alergia que dieron un resultado positivo. En ambos casos se practicaron las endodoncias con Irrigantes alternativos como solución fisiológica y clorhexidina ([Kaufman et. al., 1989](#)).

### **COMPLICACIONES POR EXTRUSIÓN DEL HIPOCLORITO, MÁS ALLÁ DEL ÁPICE**

Ante esta situación, se presentan manifestaciones clínicas entre las que destacan, quemaduras químicas y necrosis tisular, así como, la presencia de inflamación edematosa, e inflamación hemorrágica, o ambas. También, puede existir, diseminación de la inflamación en zonas más allá de la región esperada. La aparición súbita de dolor, es una característica de daño tisular. En el caso de accidentes de procedimiento, como, perforación del diente a tratar, puede escapar por esa zona el hipoclorito, provocando de esta forma el contacto con los tejidos ([Becking, 1991](#); [Gatot et. al., 1991](#); [Neaverth et. al., 1990](#)).

Puede haber una reabsorción externa, o una sinusitis aguda, si existe afección del seno maxilar como consecuencia de este accidente ([Gernhardt et. al., 2004](#); [Becking, 1991](#); [Kavanagh et. al., 1998](#)).

Casos de presencia de equimosis, hematoma y sangrado intersticial, así como, complicaciones neurológicas como parestesia o anestesia de los nervios afectados, se han relacionado a consecuencia de la extrusión del hipoclorito de sodio ([Mehra et. al., 2000](#)).

Otros estudios han revelado casos, donde existen complicaciones neurológicas secundarias, debido también a la extrusión de hipoclorito, en los tejidos blandos faciales. Las características clínicas comunes fueron las parestesias del nervio facial ([Witton et. al., 2005](#); [Becking, 1991](#)), obstrucción en la vía aérea superior, por inflamación de la zona, o por ingestión de hipoclorito. Sólo en los casos más graves, la vía aérea podría estar comprometida ([Bowden et. al., 2006](#)).

## FORMA DE PREVENCIÓN

1. El odontólogo, debe diagnosticar correctamente cada caso, tanto clínica como radiográficamente, tomando en cuenta la presencia de ápices inmaduros, la reabsorción radicular, perforaciones apicales, o cualquier otra condición en que puede resultar más grande de lo habitual el foramen apical ([Hauman et. al., 2003](#)).
2. Usar babero de plástico para proteger la ropa del paciente
3. Protección de los ojos para paciente y operador
4. La utilización de un dique de goma para el aislamiento de los dientes en tratamiento ([Spencer et. al., 2007](#)).
5. La presentación de hipoclorito de sodio o bien otros Irrigantes en cartuchos; como los de anestesia es potencialmente peligrosa y debe ser evitada ([Pontes et. al., 2008](#)).
6. Usar agujas para irrigación con vía de escape lateral, así como llevar la aguja un mínimo de 2 mm menos que la longitud de trabajo, colocando un tope de goma con la medición adecuada ([Spencer et. al., 2007](#)).
7. La irrigación debe realizarse lentamente, con movimientos suaves de la aguja, para evitar la excesiva presión durante la irrigación ([Spencer et. al., 2007](#)).

## GLUCONATO DE CLORHEXIDINA

---

La clorhexidina, es el antimicrobiano más estudiado y más eficaz para la inhibición de la placa (Schroeder, 1969).

La clorhexidina, pertenece al grupo de antisépticos bisbiguanídicos, posee una molécula simétrica, compuesta de dos anillos clorofenólicos y dos grupos de biguanida, conectados por un puente central de hexametileno (Figura 10). Es una base fuerte dicatiónica, su pH es menor de 3.5, con dos cargas más a cada extremo (Löe *et. al.*, 1970).

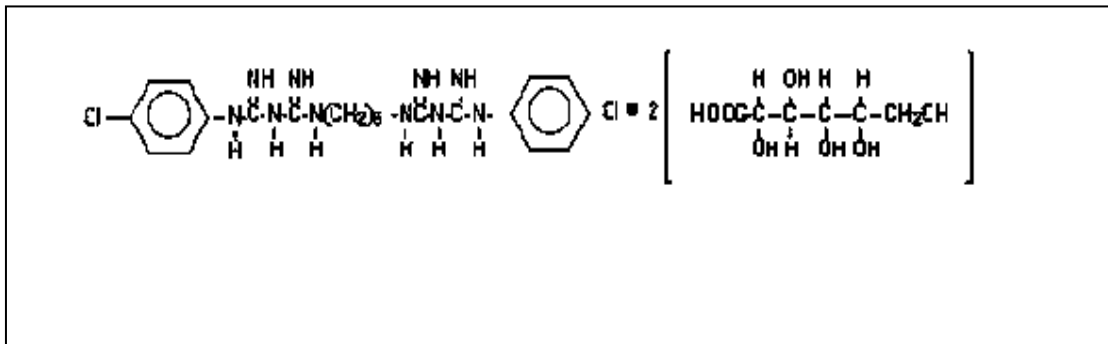


FIGURA 10. Molécula de Gluconato de Clorhexidina (Polaco, 2011).

## MECANISMO DE ACCIÓN

## EFFECTO BACTERICIDA Y BACTERIOSTÁTICO

El efecto bactericida está, íntimamente relacionado, a las altas concentraciones. La actividad antimicrobiana de la clorhexidina, se debe a que es absorbida por la pared celular, provocando la rotura y pérdida de los componentes celulares. El efecto bacteriostático, se lleva acabo, cuando se tienen bajas concentraciones, este efecto ocurre debido a la lenta liberación de la clorhexidina. Se ha dicho, que el efecto bacteriostático de la clorhexidina, es de mayor importancia, que el efecto bactericida ([Fardal et. al., 1986](#)).

### **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE AMPLIO ESPECTRO**

Altamente efectivo ante microorganismos: gram positivos, gram negativos, levaduras, hongos, anaerobios facultativos, aerobios ([Fardal et. al., 1986](#)).

Algunos autores, han demostrado su alta efectividad ante los siguientes microorganismos: estafilococos, estreptococos mutans, salivaris, escherichia coli, ya que son altamente susceptibles a la clorhexidina; el estreptococo sanguis posee susceptibilidad intermedia y el estreptococo klebsiella posee baja susceptibilidad ([Fardal et. al., 1986](#)).

### **SUSTANTIVIDAD**

Es la capacidad antimicrobiana, de permanecer por largos periodos. El gluconato de clorhexidina, es adsorbido por la hidroxiapatita de la superficie dental y las proteínas salivales y es subsecuentemente liberado, cuando disminuye la cantidad del mismo, en el medio bucal ([Fardal et. al., 1986](#)).

Debido a las propiedades catiónicas de la clorhexidina, ésta, se une a la hidroxiapatita del esmalte dental, a la película de la superficie de diente, a proteínas salivares, a bacterias y a polisacáridos extracelulares de origen bacteriano.

La clorhexidina, posee un amplio espectro antibacteriano residual, hasta por 168 horas posteriores a su aplicación. Algunos estudios sugieren que, la clorhexidina tiene efectos tóxicos, sobre células humanas y tejidos, se han reportado: daño celular, muerte celular e Inhibición de la síntesis de proteínas en cultivos de fibroblastos humanos ([Segura et. al., 1999](#)).

### **TOXICOLOGÍA, SEGURIDAD Y EFECTOS SECUNDARIOS**

La clorhexidina, presenta una mínima absorción a través de la piel y mucosas debido a su naturaleza catiónica. Estudios realizados en animales, muestran que la principal ruta de excreción de la clorhexidina, es por las heces. No se ha descrito toxicidad sistémica por aplicación tópica o ingestión. La dosis letal por vía oral es de 1800 mg/kg y por vía intravenosa es de 22 mg/kg, en estudios realizados en ratones. No presenta actividad teratogénica en modelos animales ([Winrow, 1973](#)).

Tras un fuerte calentamiento de la clorhexidina, se puede formar 4-cloroanilina, que ha demostrado ser un compuesto cancerígeno y mutagénico ([Winrow, 1973](#)).

La normativa europea, establece un valor máximo de este compuesto en los preparados de clorhexidina de 500 ppm. Los productos que se encuentran en el mercado, no alcanzan valores superiores a 5 ppm, incluso tras exposición durante largos periodos de tiempo a temperaturas superiores a 40° C.

Estudios en animales, no han demostrado la metabolización en el organismo de clorhexidina a 4-cloroanilina ([Winrow, 1973](#)).

Para evitar en lo posible la aparición en los distintos preparados de este compuesto, se aconseja conservar el producto en botellas de color oscuro, en frío y alejadas de la radiación solar.

La utilización prolongada de clorhexidina, no está asociada a cambios en la flora oral o a la aparición, de cepas ([Schiott, et. al., 1970](#)).

## **EFFECTOS SECUNDARIOS TRAS LA UTILIZACIÓN DE LA CLORHEXIDINA**

- Reacciones de hipersensibilidad ([Beaudouin et. al., 2004](#); [Krautheim et. al., 2004](#)).
- Pigmentación de los dientes, de algunos materiales de restauración y del dorso de la lengua ([Addy, 2000](#)).
- Erosión de la mucosa ([Addy, 2000](#)).
- Alteraciones en la cicatrización. Algunos estudios *in vitro*, han demostrado cierta acción de la clorhexidina en la inhibición de la proliferación de cultivos de fibroblastos. Sin embargo, no se ha encontrado en estudios *in vivo*, que la utilización de clorhexidina a las concentraciones habituales, tras la realización de procedimientos de cirugía periodontal, produzca alteraciones en la cicatrización, por el contrario se encontró una más rápida remisión de los síntomas inflamatorios ([Sanz et. al., 1989](#)).
- Degradación de la molécula de clorhexidina a paracloranilina. La clorhexidina, cuando está almacenada, no parece degradarse para liberar paracloranilina, ni tampoco en los procesos metabólicos. Roberts en 1981, observó que otras bisbiguanidas que carecen de grupos paracloranilínicos causan pigmentaciones parecidas a las de la clorhexidina.

La clorhexidina en conjunto con la utilización del hipoclorito de sodio, puede formar cloroanilina, que ha demostrado ser un compuesto cancerígeno y mutagénico ([Winrow, 1973](#)).

Se han descrito efectos secundarios tras la utilización de la clorhexidina: entre ellos la alteración en la cicatrización. Por lo anteriormente expuesto, se propone en este trabajo, establecer la metodología más eficaz, para el posible reemplazo del hipoclorito de sodio y la clorhexidina (ampliamente utilizado en clínica como soluciones de irrigación de conductos), por lo tanto, sugerimos elegir la mejor metodología para estudiar el efecto del agua ozonificada y el agua alcalina, como otra alternativa de solución irrigante puesto que estas podrían resultar eficaces, ya que presentan propiedades antimicrobianas y baja citotoxicidad a los tejidos periapicales.

## **AGUA OZONIFICADA**

- El ozono, es la forma alotrópica del oxígeno, ésta se forma cuando dos átomos del oxígeno estable, son excitados y se convierten en tres átomos de oxígeno activo e inestable con un poder germicida de amplio espectro, capaz de eliminar y destruir bacterias, virus, hongos y esporas ([Kuchel PW et. al., 1997](#)).
- El ozono, es el segundo elemento, con mayor poder oxidante después del flúor.
- El ozono se desdobra en oxígeno, siendo por lo tanto, más beneficioso cuando se compara con el cloro y el dióxido de cloro ([Bocci V, 1999](#)).

Fue en la Universidad de Basilea, en Suiza, en 1840, cuando el químico alemán Christian Federick Shonbein lo descubrió, pero fue hasta 1917 durante la primera guerra mundial, cuando el Dr. Wolf inventó el primer aparato para ozonoterapia ([Walker M, 1979](#)).

El odontólogo alemán E. Fisch, comienza la aplicación del ozono, en los tratamientos dentales con enjuagues de agua ozonizada (Figura 11).



FIGURA 11. El agua ozonizada ha demostrado ser un agente que provoca hemostasis reduciendo el sangrado de las encías y aumenta la oxigenación local suprimiendo e inhibiendo la proliferación bacteriana ([Martínez, 1990](#)).

Existen diferentes aparatos generadores de ozono y según su proceso electrónico, pueden producir ozono en una cantidad baja, media y alta, según su aplicación en el campo médico. Existen tres formas de generar ozono, por medio de descarga en corona (Figura 12); plasma en frío (Figura 13); y rayos ultravioleta. Los que producen ozono, por medio de descarga en corona, necesitan la alimentación externa de oxígeno por medio de un tanque y tienen una producción alta de ozono. Los generadores de ozono por medio de Plasma en frío, consisten en una sonda de cristal con gas He, Ne; y Ar, se activa por una fuente eléctrica que al ponerse en contacto con los tejidos estimula el oxígeno contenido en la Hemoglobina produciendo el ozono. Mientras que los generadores de ozono por medio de rayos ultravioleta, también necesitan de un tanque de oxígeno como fuente de alimentación externa.





**FIGURA 12.** Aparato generador de ozono por descarga en corona.



**FIGURA 13.** Generador de ozono Primo LOGO3 por plasma en frío.

En el campo dental, los aparatos generadores de ozono que más se usan son: por descarga en corona; o plasma en frío, siendo éste el que tiene mayor aplicación en odontología, ya que cuenta, con varias sondas, para diferentes aplicaciones, además de no necesitar conectarlo a un tanque de oxígeno, pues éste sistema reproduce el oxígeno que se encuentra en los tejidos, y al colocar la sonda del aparato sobre la superficie afectada,

ésta produce una reacción de estimulación de los átomos de oxígeno de la sangre, convirtiéndolos en átomos de ozono, en cantidades necesarias, para regenerar el área dañada sin riesgos de intoxicación.

El ozono, tiene un gran efecto germicida de amplio espectro, con la capacidad de eliminar y destruir en poco tiempo bacterias, virus, hongos y esporas lo que impide la reproducción de las bacterias y modifica la estructura celular de los virus, matándolos al mismo tiempo, destruyendo su estructura celular. Además de su efecto germicida, produce un aumento en el tejido sanguíneo y estimula los glóbulos rojos, lo que provoca una mayor oxigenación de la sangre, con mejor circulación, aumentando las proteínas y produciendo una acción antiinflamatoria.

El ozono, tiene un gran número de aplicaciones en el campo dental y se puede utilizar en tratamientos periodontales, cirugías, desinfección de cavidades y tratamiento de enfermedades fúngicas en la cavidad bucal, aftas, herpes, estomatitis, caries dental, heridas inflamadas, hemorragias, extracciones (antes y después), peri-implantitis, pulpitis, desinfección craneomandibulares, etc; ([Rickard GD, et. al., 2004](#)).

## **AGUA ALCALINA**

El agua alcalina, contiene en su composición, una gran cantidad de iones y electrolitos alcalinos, así como una gran carga de electrones, que le dan su carácter antioxidante. El agua alcalina, es el tratamiento más novedoso, contra las enfermedades degenerativas, pues restaura las condiciones óptimas del entorno celular y restablece el balance que se pierde con el paso del tiempo (Figura 14). El funcionamiento del agua alcalina es, en primer lugar, agua y, gracias a su reducido tamaño, transporta con facilidad su carga de

electrones y los minerales alcalinos que contiene (calcio, magnesio, potasio y sodio), se incorporarán con facilidad al entorno celular para liberar su carga benéfica y revertir los efectos de la acidez y la oxidación natural del organismo. El agua alcalina contiene gran cantidad de iones y electrolitos alcalinos, así como una gran carga de electrones, que le dan su carácter antioxidante.



FIGURA 14. El agua alcalina antioxidante purifica nuestro organismo y nuestra sangre, eliminando los desechos, residuos y toxinas.

Las bacterias viven en un medio ácido benéfico para su desarrollo y multiplicación. Al romper con ese medio mueren, lográndose el objetivo principal de la irrigación, evitándose de esta manera la citotoxicidad y por ende la necrosis a nivel de las células progenitoras del ligamento periodontal.

## CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Es una sustancia inodora, incolora, transparente, con ligero sabor salino. El potencial del hidrógeno (pH) fluctúa de 9 a 11, esto denota su gran alcalinidad. Su capacidad antioxidante se comprueba por su elevada carga eléctrica negativa desde -100 hasta -900 milivoltios, es prácticamente imposible estabilizar molecularmente, una sustancia, que libera electrones con tanta facilidad. El envase que la contiene, está diseñado, para mantenerla en buen estado hasta por 6 meses. Una característica común para los dos tipos de agua, es el tamaño de sus racimos o aglutinamientos moleculares. En el agua normal son de 14 ó 18 moléculas por racimo, mientras que en esta microagua son de 5 ó 6. Esto es algo verdaderamente admirable, ya que sabemos que el agua normal es, por si sola, el solvente universal, pues disuelve hasta las rocas. Esta agua pequeña o microagua, disuelve más rápidamente todo material y lo transporta velozmente hasta las partes más profundas del organismo: nutriendo y limpiando (elimina los residuos ácidos del cuerpo).

## ENDODONCIA REGENERATIVA

Es el nuevo campo de la endodoncia, que consiste, en la regeneración de las estructuras dentales y la revitalización de los dientes ([Murray et. al., 2004](#)).

Profesionales de endodoncia, apoyan el uso de células madre y técnicas de ingeniería de tejidos, para ofrecer más procedimientos efectivos de regeneración de los pacientes ([Epelman et. al., 2009](#)). Los avances en la regeneración de tejidos oro-faciales, se basan, en las contribuciones de la biología molecular, biología de células madre, biología del desarrollo, el proyecto del genoma humano, y en el desarrollo de nuevos biomateriales. Estas disciplinas, se han fusionado en la llamada Ingeniería tisular. Este campo brinda

nuevas modalidades de ingeniería de tejidos dentales, incluyendo la generación de dientes ([Lanza et. al., 1997](#)).

Recientemente, diversos investigadores han propuesto crear nuevas perspectivas para tratamientos aplicados en clínica, basados en células madre o progenitoras. Aquí hay algunos ejemplos: un grupo en Washington aisló células madre o progenitoras pulpares capaces de crear dentina después de la trasplantación ([Gronthos et. al., 2004](#)); otro grupo estudió *in vitro*, las células progenitoras, de los gérmenes dentales en ratas, al realizar el estudio, observaron que estas células fueron capaces de desarrollar coronas dentales con dentina y esmalte ([Duailibi et. al., 2004](#)).

Otro grupo fue capaz de realizar nuevos dientes *ex situ* mediante el transplante de células troncales embriológicas ([Ohazama et. al., 2004](#)).

El término de célula madre (troncal o progenitora), hace referencia a una célula que cumple las siguientes condiciones: es capaz de autorrenovarse y diferenciarse.

La célula progenitora por excelencia es el cigoto, que es la unión de dos gametos, los cuales, al fusionarse, forman una célula que dará origen a todo un organismo y sus anexos.

En el humano, al igual que en otros mamíferos, la gestación de un individuo lleva un orden establecido de cigoto, mórula, gástrula, embrión trilaminar, feto y, finalmente, producto a término. Este proceso va en una sola dirección y es irreversible, caracterizado por una alta tasa de proliferación aunada a una especialización de los tejidos ([Maienschein et. al., 2010](#); [Meyer et. al., 2009](#)).

Actualmente existen aplicaciones de terapia celular ampliamente aceptadas y difundidas por la comunidad científica mundial, las cuales podemos dividir en: regeneración, rejuvenecimiento y reemplazo, dependiendo del objetivo que se persiga ([Nelson et. al., 2008](#)).

## **CÉLULAS MADRE**

Llamadas también, células stem, son células del embrión u organismo adulto que tiene, bajo ciertas condiciones, la habilidad de reproducirse a sí misma. Puede dar pie a células especializadas que conforman los tejidos y órganos del cuerpo ([Braut et. al., 2003](#)).

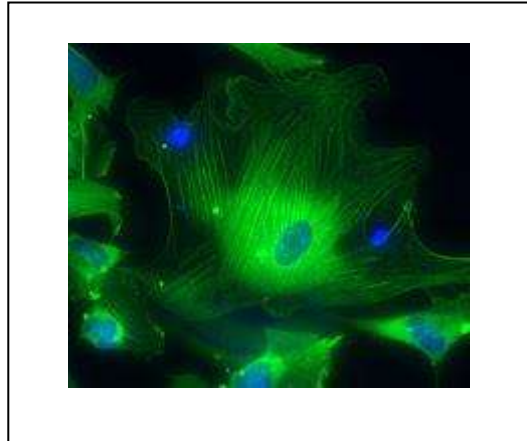
Las células madre o stem inicialmente atraviesan una división celular asimétrica en la cual una célula hija es un duplicado de las células stem original. Sin embargo, las demás células stem, atraviesan más divisiones celulares y producen células progenitoras ([Fuchs, 2002](#)).

Las células progenitoras (Figura 15), también células precursoras pueden dividirse más como un grupo de células amplificadoras en tránsito y eventualmente dar pie a un grupo de células diferenciadas.

Las células progenitoras o precursoras, pueden reemplazar a las células que estén lesionadas o muertas y reparar así el defecto. Después de la diferenciación terminal, las células, son capaces de mantener su integridad y funciones, y así lograr regeneración tisular.

Las células stem, se sitúan, no sólo en el embrión, sino también en personas adultas. Se han localizado en la pulpa dental, ligamento periodontal, médula ósea, sangre, la córnea y

la retina del ojo, el músculo esquelético, el hígado, piel, el recubrimiento del tracto gastrointestinal y en el páncreas ([Seo et. al., 2004](#)).



**FIGURA 15.** Microfotografía de las células progenitoras del ligamento periodontal (PDLSCs), observadas mediante inmunofluorescencia indirecta ([Nieto A, 2010](#)).

## CONCEPTO DE REPARACIÓN Y REGENERACIÓN DE LOS TEJIDOS

Una lesión, puede desencadenar una reacción básica de defensa del organismo: la inflamación. Para devolver la continuidad de los tejidos perdidos y restablecer la función, es necesario que se desarrolle el proceso de cicatrización ([Andreasen et. al., 2010](#)).

El proceso de cicatrización, es el mismo en todos los tejidos del organismo, pero pueden existir variantes en la clínica, de acuerdo a los tejidos involucrados. Los tejidos dentales, son únicos, en comparación con la mayoría de los tejidos presentes en el resto del organismo, debido a su marcada capacidad de reparación y multiplicidad del sistema celular involucrados.

Existen dos formas de curar las heridas, una es a partir de la regeneración de los tejidos y otra a partir de la reparación.

El término regeneración, es aplicado a aquellos fenómenos biológicos, en los cuales la anatomía y función de los tejidos lesionados, son restaurados en forma completa.

En cambio, la reparación o formación de cicatriz, consiste en procesos biológicos, en donde se restablece la continuidad del tejido lesionado, por una nueva formación tisular, que no restaura su anatomía y función ([Andreasen et. al., 2010](#)).

Diversos factores, ocasionan fenómenos reparativos o regenerativos en la cavidad oral: la capacidad regenerativa de células afectadas, extensión de la lesión y actividad proliferativa del estroma conjuntivo.

Del mismo modo, deben ser consideradas, la existencia de poblaciones celulares específicas del tejido, presentes después de la lesión (de no ser así la reparación ocurrirá en lugar de la regeneración), la existencia de condiciones conductivas, para la migración de células específicas, al sitio de la lesión y por último, la presencia o no de elementos, como cuerpos extraños contaminantes y/o bacterias ([Andreasen et. al., 2010](#)).

Al igual que ocurre en los diferentes tejidos del organismo, las lesiones en la región pulpo-periodontal provocan una reacción inflamatoria, con la liberación de una cantidad de señales, que promueven los procesos de curación y reparación.

Dando lugar a la inducción sobre poblaciones celulares, a la proliferación, a la migración o diferenciación.



## FASES DE LA REPARACIÓN

La reparación, es un fenómeno que se continúa sin límite preciso con la inflamación, no hay reparación sin inflamación y viceversa. Desde el inicio del proceso inflamatorio, podemos hablar del comienzo de la reparación ([Segura, 1996](#)).

Los eventos de la reparación, ocurren un poco más tarde en relación con la inflamación; sin embargo, existe una sobreposición, ya que en la inflamación aguda y crónica se produce la fagocitosis, fundamental para instalarse el proceso de reparación, así como la fibroplasia y la angiogénesis, comunes a la fase crónica y a la reparación ([Trowbrinde et. al., 1996](#)).

Cuando el tejido es lesionado, la sucesión de eventos que ocurren pueden ser divididos en tres etapas denominadas:

1. Fase inflamatoria que se subdivide en: fase hemostática y fase Inflamatoria propiamente dicha.
2. Fase proliferativa.
3. Fase de remodelado.

## FASE HEMOSTÁTICA

La lesión tisular, causa una ruptura de los vasos y consiguiente extravasación. Por la acción de sustancias vasoactivas, como son las catecolaminas, producen una vasoconstricción inicial, reduciendo transitoriamente el sangrado. Se activan las vías

extrínsecas e intrínsecas del coágulo sanguíneo, junto con la vasoconstricción, se restablece la hemostasia y brindan, una matriz provisional para la migración celular (Trowbrinde *et. al.*, 1996).

Las plaquetas se adhieren y sufren cambios morfológicos, para favorecer la formación de un tapón hemostático y en liberar mediadores de cicatrización. La fibrina, tiene su efecto principal, en la angiogénesis y la restauración de la estructura vascular, además, juega un papel importante, en la cicatrización de herida, por su capacidad de vincular la fibronectina.

La fibronectina, es una glicoproteína compleja, que participa de muchas maneras, en la cicatrización de heridas, actuando en la agregación plaquetaria. Constituye un andamio para la migración celular y además guía la deposición de colágeno dentro del tejido de granulación. Otros factores de crecimiento, factores quimiotácticos y sustancias vasoactivas, son desencadenantes, para que se desarrolle una respuesta inflamatoria (Trowbrinde *et. al.*, 1996).

## **FASE INFLAMATORIA PROPIAMENTE DICHA**

Se caracteriza, por la formación de un exudado tisular, favorecedor para el reclutamiento de células liberadas de moléculas proinflamatorias, necesarias para que, el proceso inflamatorio, se ponga en funcionamiento.

Además, este exudado, diluye las toxinas bacterianas y remueve los agentes cuya función, es promover la vasodilatación de capilares y arteriolas en la región. Se activan los sistemas

de complemento y de las cininas, lo que ayuda a mantener esta vasodilatación. Se produce la llegada de los neutrófilos, polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos ([Gottrup, 1992](#)).

## FASE PROLIFERATIVA

Es una continuidad de la fase inflamatoria y se caracteriza por proliferación y migración de fibroblastos y producción de tejido conjuntivo. Los productos activados de complemento actúan atrayendo macrófagos al sitio. Estos a su vez, liberan factores de crecimiento que estimulan la migración de fibroblastos y secreción de diferentes tipos de colágeno, que sumado a la formación de nuevos vasos, se genera el tejido de granulación ([Trowbridge, 1996](#)).

Los fibroblastos producen y liberan proteoglicanos y glucosaminoglicanos, los cuales son constituyentes de la matriz del tejido de granulación. Las moléculas celulares, crean una interdependencia, entre el tejido fibroso formado y una nueva red vascular, dada por la necesidad de nutrientes del nuevo tejido de soporte y protección de la matriz para la angiogénesis.

La angiogénesis, puede ser definida, como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, a partir de migración, proliferación y formación dirigida de lumen endotelial y es indispensable, para el suministro de oxígeno, a los tejidos recién formados o isquémicos ([Smith \*et. al.\*, 2002](#)).

## FASE DE REMODELADO

Durante esta fase, el tejido de granulación, es remodelado y madurado hacia una formación de cicatriz. Se inicia el proceso de osteogénesis y mineralización.

La formación de cristales de hidroxapatita, se realiza diez días después, del comienzo de la reparación. Hay un aumento del pH y de la enzima fosfatasa alcalina. Esta promueve, la precipitación de fosfato de calcio, el cual inicia la mineralización.

El suministro sanguíneo, es de suma importancia tornándose indispensable, para finalizar el proceso reparativo. La reparación de cemento resulta de la diferenciación de cementoblastos, a partir, de células indiferenciadas del ligamento periodontal o tejido de granulación ([Lasala, 1992](#)).

Estas células, para Beertsen W, muestran niveles elevados de fosfatasa enzimática, la cual esta íntimamente relacionada con la formación de hueso y cemento. Al actuar en conjunto con el ligamento periodontal, los fibroblastos, los cementoblastos y osteoblastos, originan la reparación de los tejidos lesionados ([Lasala, 1992](#)).

Se afirma que, si se considerase como criterio básico de éxito de tratamiento endodóntico, la reparación de los tejidos periapicales con regeneración del ligamento, del cemento, del hueso, entonces los índices de tratamiento, descenderían de manera importante ([Gutmann, 1992](#)).

Existen pocos estudios relacionados, que le dan la importancia a las células troncales o progenitoras del ligamento periodontal, la mayoría de los artículos, están relacionados con

la eliminación de bacterias y dejan a un lado la importancia que tienen estas células, en la regeneración y reparación de los tejidos relacionados tan íntimamente al momento de llevar a cabo un tratamiento endodóntico. La desinfección intraconducto, es un paso crucial en los procedimientos de la endodoncia.

El tratamiento endodóntico carece de una estandarización, numerosos protocolos han sido reportados sin el conocimiento del efecto en la supervivencia de las células progenitoras.

El objetivo de este estudio es encontrar la metodología adecuada, a través de la consulta de diversas fuentes, para probar la hipótesis de que, diferentes protocolos de irrigación alteran la supervivencia de las células progenitoras de la papila apical ([Treviño et. al., 2011](#)). Éste estudio, señala que el aislamiento de células progenitoras fueron generadas a partir del tejido de la papila apical de terceros molares humanos inmaduros, y una subpoblación de células que expresan STRO-1, posteriormente fueron seleccionadas y expandidas *in vitro*. Se estandarizaron segmentos de la raíz en cinco grupos, cada segmento fue irrigado utilizando los siguientes protocolos:

1. EDTA al 17%,
2. NaOCl al 6% / EDTA al 17%,
3. EDTA al 17% / CHX al 2%,
4. NaOCl al 6% / EDTA al 17% / NaOCl al 6% / alcohol isopropílico / CHX al 2%.

Posteriormente, las células progenitoras de la papila apical, se mezclaron en plaquetas ricas en plasma, se sembraron en las puntas de las raíces, y se cultivaron durante 21 días.

Después las raíces fueron descalcificadas, procesadas inmuno-histoquímicamente, y teñidas con vimentina. La viabilidad celular (vimentina-positivas) se calculó en base a recuentos de células progenitoras (A-PRO-3) para cada grupo ([Treviño et. al., 2011](#)).

La irrigación con EDTA al 17% mejoró la supervivencia celular, seguido por la irrigación de con NaOCl al 17%, EDTA al 6% / hipoclorito de sodio al 6%, en comparación con los 2 grupos que contenían CHX al 2%. Por el contrario, los protocolos que incluyen CHX al 2% carecían de adecuada viabilidad celular ([Treviño et. al., 2011](#)).

En conjunto, los resultados sugieren que todos los Irrigantes afectan en gran medida la supervivencia de las células progenitoras de la papila apical y que la utilización de EDTA en los protocolos de irrigación, podría ser beneficiosa en los procedimientos de regeneración.

João, y cols. 2008, estudiaron, el efecto sobre el tejido conectivo subcutáneo en ratas, cuando utilizaron solución salina estéril al 0,9%, hipoclorito sódico al 2,5%, NaOCl al 5,25% y solución de gluconato de clorhexidina al 2%, marcaron seis círculos en el dorso de la piel de 24 ratas Wistar macho, dejando 2 cm entre cada círculo, con una jeringa, inyectaron por vía subcutánea 0,1 ml de cada solución de irrigación en los 5 círculos. En el sexto círculo, no utilizaron irrigante (grupo control).

Las evaluaciones, las llevaron a cabo a las 2 hrs, 48 hrs, 14 y 30 días después del procedimiento. Las muestras de tejido las extirparon, embebidos en bloques de parafina y las secciones de 3 micras de espesor las obtuvieron y les colocaron tinciones a base de hematoxilina y eosina. Las áreas de reacción inflamatoria las evaluaron y analizaron estadísticamente mediante ANOVA y prueba de Tukey. El grupo control mostró pocas o

nulas áreas inflamatorias en el tejido subcutáneo. La solución salina al 0,9%, clorhexidina al 2.0% y NaOCl al 2,5% mostraron una buena biocompatibilidad, con reacción inflamatoria muy leve, detectada a los 14 días y la reparación de tejidos se produjo a 30 días.

El NaOCl al 5,25% fue el irrigante más tóxico, permaneció elevado el número de células inflamatorias en los días 14 y 30. El grupo tratado con gel de clorhexidina al 2,0%, presentó una respuesta inflamatoria moderada a los 14 días, disminuyendo ésta a los 30 días, siendo considerado similar a la del grupo control.

Respecto al agua ozonizada, Malanchuk y Cols., 2000, realizaron un estudio en fracturas mandibulares humanas, para evaluar la acción antimicrobiana del agua destilada ozonizada a una concentración de 0.3 mg/l, estableciendo una acción inmunomoduladora del ozono respecto a los factores de inmunidad oral, aumentando la resistencia y disminuyendo la expresión de la inflamación de la mucosa oral, concluyendo que, todo esto permite decir que la acción antimicrobiana del ozono es medida mediante la activación inmunitaria local.

## **TECNICA DE CULTIVO CELULAR**

Gran parte de las células que tienen capacidad de proliferar, especialmente las células madre, pueden ser mantenidas y cultivadas en el laboratorio. Para ello, en primer lugar, se requiere contar con una adecuada fuente de células a partir de la cual se aíslan las células a cultivar.

En cada caso, las muestras que contienen las células aisladas habrán de ser tratadas en el laboratorio utilizando diferentes métodos de aislamiento. Los métodos de aislamiento más

utilizados son los métodos enzimáticos y las técnicas de explante. En el primer caso, las muestras biológicas son tratadas enzimáticamente para eliminar la matriz extracelular y aislar las células de interés. Las enzimas más utilizadas para este procedimiento son las colagenasas, las dispasas y la tripsina.

En segundo lugar, las técnicas de explante consisten en la utilización de fragmentos de tejido de tamaño macroscópico que son directamente mantenidos en cultivos. De este modo, proliferarán las células a partir de los fragmentos de tejido generándose cultivos primarios de las células procedentes de éste.

Una vez extraídas, las células se mantiene en cultivo en el laboratorio utilizando diferentes medios específicos que permiten el crecimiento y proliferación de dichas células. Las células en cultivo se pueden almacenar en estado vital utilizando cámaras de cultivo a 37°C y una atmósfera enriquecida de CO<sub>2</sub> o bien pueden congelarse y mantenerse en estado quiescente en bancos de tejidos hasta el momento de su utilización ([Gómez de Ferraris et. al., 2008](#)). Un ejemplo de este tipo de generación de cultivos, pudiera aplicarse a células adultas, obtenidas a partir del ligamento periodontal.



## JUSTIFICACIÓN

Es necesario investigar, para adecuar los materiales y métodos más recientes, para lograr uno de los objetivos principales de la endodoncia, que es la eliminación de bacterias de los conductos radiculares; con las técnicas actuales se ha reducido significativamente la carga bacteriana del conducto radicular pero no de forma radical.

Con el objetivo de lograr una mayor desinfección, se han propuesto combinación de Irrigantes, el aumento o reducción de las concentraciones y tiempos de las soluciones, la utilización de ultrasonido.

Se han reportado algunas complicaciones con la utilización de algunos irrigantes como el hipoclorito de sodio y la clorhexidina, por tal motivo, es necesario realizar revisiones de artículos, para encontrar la mejor metodología, para el remplazo de éstos, con la finalidad de alcanzar la misma eficacia, pero reduciendo en gran medida el problema de citotoxicidad que provoca la extracción accidental de ellos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Indicar el método más eficaz para evaluar la viabilidad de células progenitoras del ligamento periodontal en presencia de hipoclorito de sodio al 2%, clorhexidina al 2%, agua ozonizada a una concentración de 0.3 mg/l, y agua alcalina, en base a la revisión de diversos artículos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Indicar la metodología más adecuada, para generar cultivos celulares, a partir, de células progenitoras del ligamento periodontal, mediante ingeniería tisular.
2. Indicar la metodología más adecuada, para evaluar la citotoxicidad, que produce el hipoclorito de sodio al 2%, en las células progenitoras del ligamento periodontal
3. Indicar la metodología más adecuada, para evaluar la citotoxicidad, que produce la clorhexidina al 2%, en las células progenitoras del ligamento periodontal
4. Indicar la metodología más adecuada, para evaluar la citotoxicidad, que produce el agua ozonizada a una concentración de 0.3mg/l, en las células progenitoras del ligamento periodontal.
5. Indicar la metodología más adecuada, para evaluar la citotoxicidad, que produce el agua alcalina, en las células progenitoras del ligamento periodontal.

## **HIPÓTESIS**

### **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La revisión bibliográfica al momento actual, permitirá proponer la metodología idónea para evaluar la viabilidad celular de las células progenitoras del ligamento periodontal, utilizando diversas soluciones irrigantes.

### **HIPÓTESIS NULA**

La revisión bibliográfica al momento actual, no permitirá proponer la metodología idónea para evaluar la viabilidad celular de las células progenitoras del ligamento periodontal, utilizando diversas soluciones irrigantes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO Y CULTIVOS CELULARES**

En primer lugar, se revisó la información referente a las técnicas empleadas para la obtención, procesamiento y cultivo de las células progenitoras del ligamento periodontal, a partir, de revistas científicas de impacto indexadas en pubmed. El periodo de revisión de las publicaciones, abarcó desde el año 2004 al año 2011. Dicha revisión, contempló de manera adicional fuentes bibliográficas, como libros y fuentes electrónicas. En segundo lugar, se indicó la metodología más adecuada y eficaz para la obtención, procesamiento y cultivo de dichas células mediante técnicas de ingeniería tisular.

### **PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD**

Para indicar la metodología, más adecuada, en pruebas de citotoxicidad, ante diferentes soluciones irrigantes, en conductos radiculares utilizados en endodoncia, enfocadas a la desinfección de superficies internas radiculares, se realizó una exhaustiva revisión de la literatura en pubmed, en los periodos indicados de manera previa. Esta revisión contempló el análisis, de la información con relación directa a la citotoxicidad generada, en componentes celulares, en contacto con: hipoclorito de sodio, clorhexidina, agua ionizada y ozonizada, respectivamente. Una vez realizada dicha revisión, se planteó, cual técnica de análisis de citotoxicidad, promueve una correcta evaluación, producida por los agentes tóxicos, en relación a estructuras vivas celulares.

## **ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LAS CUATRO SOLUCIONES QUIMICAS**

Por último, se definió la técnica a utilizarse, para sugerir un análisis comparativo, en cuanto a la citotoxicidad que pueden producir las soluciones de hipoclorito de sodio, clorhexidina, agua ionizada y ozonizada, sobre las células progenitoras del ligamento periodontal.

## RESULTADOS

Una vez realizada, la revisión de diversos artículos, se propone la siguiente metodología, para llevar a cabo, el estudio, del efecto de irrigantes empleados en endodoncia, sobre la viabilidad celular de las PDLSCs.

### MUESTRAS DE TEJIDO HUMANO

Analizadas diversas revisiones, en diferentes fuentes, se propone el utilizar, la metodología para obtener las muestras de tejido humano que permite el aislamiento eficaz de las células progenitoras del ligamento periodontal, esto de acuerdo a lo propuesto por Morrison y Cols., 2010 y Treviño y Cols., 2011. Consiste en contemplar como fuente celular, a las células progenitoras del ligamento periodontal, que se encuentran en terceros molares y premolares. Por tal motivo se propone obtener las células progenitoras del ligamento periodontal de terceros molares resultantes de cirugía, realizadas en la Facultad de Odontología de la UMSNH, o bien de premolares extraídos por prescripción de ortodóncia. Inmediatamente después de la extracción de dichos órganos dentarios los pasos a seguir son: Transportar las muestras en medios de cultivos de transporte, que consisten en solución de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), suplementar con antibiótico, antimicóticos (100U/ML de penicilina G, 100 microg/mL de estreptomicina y 0.25 microg/mL de anfotericina B) e incubar a 4°C hasta el momento de su procesamiento. La mejor metodología para el procesamiento de los explantes para generar cultivos primarios de las PDLSCs es la propuesta por Gómez de Ferraris y Cols., 2008, en donde sugiere que las

muestras biológicas sean tratadas enzimáticamente para eliminar la matriz extracelular y aislar las células de interés. Por lo cual proponemos en primer lugar: lavar en solución fisiológica salina, (las piezas dentales que de manera previa se extrajeron y almacenaron en el medio de transporte), aislar mediante fragmentación mecánica el ligamento periodontal. En segundo lugar, aislar las PDLSCs mediante colagenasa, dispasa y tripsina o técnicas de explante y sembrado directo. La técnica enzimática hace posible eliminar la matriz celular y aislar las células de interés, mientras que la de sembrado directo fija a las células progenitoras mediante contacto con el bioreactor utilizado mediante el método propuesto por Gómez de Ferraris y Campos en el 2011. En tercer lugar la técnica consiste en mantener estas células aisladas mediante centrifugación luego de la disgregación de la matriz extracelular en cámaras de cultivo tipo Falcon a 37° C, y una atmosfera de CO<sub>2</sub> suplementadas con medio de cultivo basal. El medio basal consiste en suplementar con *DMEM* anteriormente mencionado con 50mL suero bovino fetal y 10mL de antibióticos y antimicóticos en 500 mL de medio. En cuarto lugar, la metodología dada por Bradley Morrison, en el año 2011, para el subcultivo de células progenitoras celulares en monocapa o de forma bidimensional, es realizada en pocillos tipo chamber, se propone en este trabajo debido a que, este tipo de cámaras, puede observarse microscópicamente el grado de viabilidad celular.

La inmersión de células en irrigantes empleados en endodoncia se propone durante un subcultivo en estas cámaras tipo chamber, por tiempos de 2hr., 6hr., 12hr., 24hr., 48hr.



En este trabajo se proponen estudiar 4 grupos:

- Grupo 1, en cada dos pocillos se les adiciona hipoclorito de sodio al 2%,
- Grupo 2, en otra cámara plana de dos pocillos se les adiciona clorhexidina al 2%,
- Grupo 3, en otra cámara plana de dos pocillos se adiciona agua ozonizada al 0.3 mg/l,
- Grupo 4, en otra cámara plana de dos pocillos se adiciona agua alcalina.

La metodología propuestas por Trubiani y Cols., 2005; Danielle y Cols., 2010; Seo, y Cols., 2004; para el análisis histológico, inmunohistoquímico y morfológico, nos permite determinar si existe o no regeneración de las células progenitoras del ligamento periodontal.

Expuesto lo anterior la viabilidad celular es calculada en base a conteo celular para cada uno de los grupos empleando marcador específico de tinción por exclusión azul Tripan, marcadores para epifluorescencia indirecta como caspasa 2 y por último cuantificación de ADN libre sobrenadante en cámaras de pocillos múltiples.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

La literatura disponible y los estudios solo demuestran las ventajas y limitaciones de cada uno de los irrigantes y ninguno de ellos satisface por completo las necesidades de la irrigación del conducto radicular. Como lo comprueba Lin LM y Cols., en el año 1992; así como: Molander y Cols., en el año 1998, enfocándose básicamente a la importancia de eliminación total de bacterias y dejando de un lado la citotoxicidad que pudiera generar cualquier irrigante en los tejidos periodontales, a diferencia de Becker y Cols. en el año 2001, quienes ya hablaban de las propiedades ideales de los irrigantes, los cuales deberían de proporcionar una acción de lavado mecánico, ser microbicida y disolver restos de tejidos orgánicos, sin dañar los tejidos perirradiculares, si estas soluciones se extruyen al periodonto. Por otro lado Becker y Cols., en el año 2001, hablaban de que un gran número de sustancias que se han utilizado como irrigantes del conducto radicular, incluyendo ácidos (cítrico y fosfórico), agente quelante (EDTA, enzimas proteolíticas, soluciones alcalinas (hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio, urea, y el hidróxido de potasio), agentes oxidativos (peróxido de hidrógeno), soluciones anestésicas locales y solución salina, todas estas soluciones no logran cumplir en su totalidad con el principio de biocompatibilidad con los tejidos periodontales. Carson y Cols., en el año 2005; Clegg y Cols., en el 2006 así como Zehnder M, en el 2006, ellos comprueban que el irrigante endodóntico más utilizado, es el hipoclorito de sodio, utilizado a una concentración que van de 0.5% y 6.0%, ellos mencionan que la eficacia del NaOCl en relación a su efecto antibacterial y capacidad de disolución del tejido necrótico, está determinada de acuerdo al nivel de concentración, así que, entre mayor es su concentración, más tóxico será para los

tejidos, y entre menor concentración, menor poder antibacterial. Zehnder M, en el 2006, comenta también que la clorhexidina es un antiséptico potente, que es ampliamente utilizado para el control químico de la placa en la cavidad oral. Las soluciones acuosas de 0.1 a 0.2%, son recomendados para ese propósito, mientras que la concentración de clorhexidina al 2%, es la que se recomienda ampliamente en la literatura endodóntica, para la irrigación de conductos radiculares. Se cree que la clorhexidina es menos cáustica que el hipoclorito de sodio, pero esto no es totalmente cierto, ya que se ha demostrado que la solución de clorhexidina al 2% es irritante para la piel. A pesar de su utilidad como un irrigante, la clorhexidina no puede ser ampliamente recomendada como el irrigante estándar en casos endodónticos, puesto que; la clorhexidina es incapaz de disolver los restos necróticos de tejidos, y la clorhexidina es menos eficaz en bacterias Gram-negativo.

En este contexto, este trabajo consistió en encontrar la metodología más eficaz, para evaluar el grado de citotoxicidad, a nivel del ligamento periodontal, cuando de manera accidental, se extruyen diversos irrigantes de uso común y otros que pudieran sustituir en su caso a éstos. Ya que de esto depende que no se vea comprometida, la capacidad de regeneración y reparación del ligamento periodontal. Éste es el caso de las soluciones irrigadoras a base de NaOCl y Clorhexidina, que pudieran según estudios comprometer la capacidad de regeneración y reparación tisular, cuando tienen contacto con las estructuras bucodentales, comprometiendo la integridad de varias de las estructuras tanto de soporte como de nutrición periodontales. Por otro lado, las soluciones sugeridas como irrigantes podrían sustituir los irrigantes endodónticos tradicionales, como es el caso del agua ozonizada y alcalina, las cuales no han sido probadas aun, para desinfectar los conductos radiculares. Broadwater en el año 1973, nos dice que el ozono es un agente

bactericida muy eficaz y potente que puede matar microorganismos por medio de oxidación. Se ha demostrado que el ozono a baja concentración, como por ejemplo utilizándolo a 0.1 ppm, esta cantidad es suficiente, para inactivar las células bacterianas incluyendo esporas, aunque el agua ozonizada es un poderoso agente antimicrobiano frente a bacterias, hongos, protozoos y virus, no se ha mostrado interés en estudiar la actividad antibacteriana de agua ozonizada en el biofilm esto de acuerdo a información obtenida por Nagayoshi y Cols., en el 2004 y por Ibrahim, y Cols., en el 2008.

En este contexto, los irrigantes aquí expuestos no han sido investigados, para conocer el efecto tóxico sobre las células involucradas en íntimo contacto con las estructuras susceptibles a ser desinfectadas. Por ello, el motivo de este estudio consistió en; conocer el avance en el conocimiento hasta el momento actual, de los irrigantes empleados en clínica y de las diversas metodologías, que procuran procedimientos de limpieza y desinfección de conductos radiculares.

En nuestro estudio proponemos a las PDLSCs, de acuerdo al estudio realizado por Seo y Cols., en el año 2004, pues estas células se han considerado el estándar de experimentación, en endodoncia aplicada en ingeniería tisular, debido a que permiten la formación, de fibroblastos, osteoblastos, además poseen potencial de proliferación y diferenciación *in vitro* en varios linajes de células del estroma, identificando estas células, a través, de la citometría de flujo, información tomada en los artículos de Bartold, 2006; Hernández y Cols., en el año 2011. Trubiani en el 2005; Danielle y Cols., 2010 así como Seo, en el año 2004 observaron, que los tejidos periodontales al ser analizados, a través, de métodos histológicos, inmunohistoquímicos y morfométricos, nos indican si existe o no regeneración de los mismos. Por ello en este trabajo se indagó que métodos podrían ser

los mejores, para evaluar de forma correcta y eficaz dichos aspectos. Morrison y Cols., 2011, mencionan que la utilización de piezas dentales humanas para evaluar los procesos tanto de desinfección como de citotoxicidad promueven según diversos estudios el uso de piezas premolares, debido a que son fácilmente adquiribles en la clínica dental. Estas piezas en su mayoría se encuentran libres de caries además de que en la mayoría de los casos son extraídas debido a tratamientos ortodónticos. Por otro lado, se propuso la utilización de bioreactores que permitieran observar microscópicamente el grado de viabilidad celular, en este caso, sería en cámaras de pocillos tipo *chamber* con divisiones. Respecto a la técnica de cultivo celular, de acuerdo a Gómez de Ferraris y Cols., en el año 2008, ellos nos indican que las PDLSCs, deberán aislarse y cultivarse empleando técnicas enzimáticas que permitirían en su caso eliminar la matriz celular y aislar las células de interés, empleando collagenasa, dispasa y tripsina) o técnicas de explante y sembrado directo.

Por tal motivo proponemos realizar, pruebas de viabilidad celular, una vez, empleados los irrigantes propuestos, ya que estos determinarán, si las PDLSCs, son capaces de regenerarse, al tener contacto de forma *in vitro* con todas estas sustancias. Todo este conocimiento y la realización de estas técnicas podrían en un momento dado, generar conocimiento básico en odontología endodóntica y su posible aplicación clínica futura.

## CONCLUSIONES

1. La metodología sugerida para la generación de cultivos celulares, a partir de células progenitoras del ligamento periodontal mediante ingeniería tisular, se propone utilizando la metodología de Treviño y Cols., 2011 y Morrison y Cols., 2011 que plantea el aislamiento, cultivo y expansión *in vitro* de las PDLSCs, empleando explantes de tejidos adultos de la papila apical del ligamento periodontal de piezas sanas de molares inmaduros o premolares, extraídas debido a prescripción ortodóntica, ya que estas presentan un alto índice de viabilidad celular.
2. La metodología sugerida para la evaluación de la citotoxicidad que produce el NaOCl en las células progenitoras de la papila apical, se propone utilizando las técnicas de Treviño y Cols., 2011, pero a una concentración menor debido a que ellos reportaron una alta citotoxicidad cuando fue empleado al 17%. La concentración que proponemos es al 2% para evaluar no solo su efecto citotóxico sino también su efecto bactericida al emplearlo como irrigante en terapia endodóntica.
3. La metodología sugerida para evaluar la citotoxicidad que produce la clorhexidina a una concentración del 2% en las PDLSCs mediante ingeniería tisular es utilizando, tanto los protocolos de Treviño y cols., 2011, así como los empleados por Basrani y cols., 1999, los cuales emplearon la clorhexidina 0,2% en combinación con NaOCl 2,5%. Esto permitió determinar ciertos parámetros de viabilidad celular, incluyendo recuentos celulares y marcadores específicos de las células progenitoras.

4. La metodología sugerida para la evaluación de la citotoxicidad del agua ozonizada en las PDLSCs, no es propuesta en la literatura, ya que no ha sido encontrada en la bibliografía revisada hasta el momento actual. Sin embargo, existen modelos previos, en donde el agua ozonizada se utilizó en fracturas mandibulares debido a su importante acción inmunomoduladora, ya que aumenta la resistencia y disminuye la expresión de la inflamación de la mucosa oral. Por tal motivo el agua ozonizada puede tener importantes implicaciones en endodoncia clínica.
5. La metodología para la evaluación de la citotoxicidad del agua alcalina en las PDLSCs, no fue encontrada en la bibliografía hasta el momento actual. Sin embargo se postula su utilización, ya que los minerales alcalinos, restauran las condiciones óptimas del entorno celular en las enfermedades degenerativas, que en caso favorable, se podría transpolar dicho modelo a la restauración o disminución de procesos inflamatorios, infecciosos y de reacción autoinmune, relacionada a la patología periodontal.

## **RECOMENDACIONES**

- Al momento de llevarse a cabo la metodología, comprobar si no existe alguna referencia nueva de este procedimiento o técnica al momento que se va a utilizar.
- Actualizar esa búsqueda de información al momento de realizar el experimento.
- Conocer los trabajos publicados recientemente en congresos internacionales.



## **SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS**

Llevar a cabo el experimento *in vitro*, con la metodología sugerida, y proponer otros protocolos, no sólo para conocer la viabilidad celular ante irrigantes, sino para observar capacidad de regeneración, de éstas células progenitoras del ligamento periodontal, mediante el empleo de marcadores propios de regeneración y/o degradación celular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Addy M (2000). Antisépticos para el tratamiento periodontal. Lindh,T. Karring, y NP. Lang E. *Periodontología clínica e implantología odontológica* (pp. 465-492). Madrid: Médica Panamericana.
2. Andreasen J.O. *Texto y Atlas a Color de lesiones traumáticas a las Estructuras Dentales*. Cuarta Edición. 2010.
3. Basrani, E. (1999) Endodoncia Integrada, 1era Edición, Colombia.
4. Beaudouin,E; Kanny,G; Morisset,M; Renaudin,JM; Mertes,M; Laxenaire,MC; Mouton,C; Jacson,F; y Moneret-Vautrin,DA. (2004). Immediate hypersensitivity to chlorhexidine: literature review. *Allergy and Immunology (Paris)*, 36(4), 123-126.
5. Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Report three cases. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1991; 71; 346-8.
6. Becker TD, Woollard GW. Endodontic irrigation. *General Dentistry*. 2001;49(3):272–276.
7. Berkovitz BKB, Holland GR, M oxham BJ. Atlas en color y texto de Anatomía Oral. Histología y Embriología .1977, 2ª edición 1992, Mosby/Doyma libros: 199-212.
8. Broadwater WT, Hoehn RC, King PH. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Journal of Applied Microbiology*. 1973;26(3):391–393.

9. Block MS, Cervini D, Chang A, Gottsegen GB. Anterior maxillary advancement using tooth-supported distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 1995;53:561-5.
10. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine. *Br J Biomed Sci.* 1999;56:270-9.
11. Bowden JR, Ethunandan M, Brennan PA. Life-threatening airway obstruction secondary to hypochlorite extrusion during root canal treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006;101:402-4.
12. Canalda C. *Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas*. Barcelona: Masson, 2001.
13. Carranza F y Bernard G. Estructuras de soporte dentario. En: Newman, Takei y Carranza editores. *Periodontología Clínica*. México. Mc Graw Hill. 9ª ed. 2004:36-58.
14. Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *Journal of Endodontics*. 2005;31(6):471–473.
15. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *Journal of Endodontics*. 2006;32(5):434–437.
16. Dolphin S, Walker M. Healing accelerated by ionozone therapy. *Physiotherapy*. 1979;65:81-2.
17. Duailibi MT. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 2004; 83:523-8.
18. Esponda Villa. *Anatomía Dental*. Sexta Edición 1981-1994.

19. Estrela C. *Mechanism of action of Sodium Hypochlorite*. Braz Dent J 2002;13(2): 113-117.
20. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. International Endodontic Journal. 2007;40(2):85–93.
21. Fuchs E. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* 2002; 3:199-209.
22. Fuchs E, Segre J. Stem cell: a new lease on life. *Cell* 2000; (100): 143-155.
23. Gatot A, Arbelle J, Leiberman A, Yanai-Inbar I. Effects of sodium hypochlorite on soft tissues after its inadvertent injection beyond the root apex. *Journal of Endodontic* 1991;17:573-4.
24. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 2004;37:272-80.
25. Gómez de Ferraris, Campos Muñoz. *Histología y Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 3ª. Edición. Editorial Medica Panamericana. 2008.
26. Gottrup F. Advances in the biology of the wound healing in: Harding KG, Leaper DL, Turner TD. eds . *Advances in wound management*. London Mc Millan Magazines 1992: 7-11.
27. Gronthos S. Human dental pulp stem cells- characterization and developmental potencial. In: Turkun M. ed. *Adult Stem Cells*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004:67-81.
28. Gutmann JL. Criterios clínicos, radiográficos e histológicos para evaluar el resultado del tratamiento endodóntico. *Clin Odont Nort* 1992;2:391-404.

29. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003;36:75-85.
30. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*. 2005;38(1):22–29.
31. <http://www.biowater.com.mx/?gclid=CPnip47fgebCFQkoPAodoGgAZQ>
32. 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: 810-30.
33. Ibrahim NZ, Abdullah M. Antimicrobial evaluation of sodium hypochlorite and ozonated water on *E. faecalis* biofilm. *Annals of Dentistry*. 2008;15(1):20–26.
34. Ingle, J. Beveridge, E. (1979) "Endodoncia". Segunda Edición. Editorial Panamericana. México.
35. Ingram III TA. Response of the human eye to accidental exposure to sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 1990;16:235-8.
36. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potencial stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96(25): 14482-6.
37. Jaques-Louis Soret (1865). Recherches sur la densite de l'zone comptes rendus de l'Academi des sciences 61: pp 941.
38. João Eduardo Gomes-Filho, Kamila Guilherme Aurelio, Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa, Pedro Felicio Estrada Bernabe. *Journal of Endodontics* 2008;15: 224-6.
39. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 1989; 15: 224-6.

40. Kavanagh CP, Taylor J. Inadvertent injection of sodium hypochlorite into the maxillary sinus. *Br Dent J* 1998; 185:336-7.
41. Krautheim, AB., Jermann,TH., y Bircher,AJ. (2004). Chlorhexidine anaphylaxis: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis*, 50(3), 113-116.
42. Kuchel PW, Ralston GB. Bioquímica General. México: McGraw-Hill; 1997.
43. Lasala A. Reparación y pronóstico en endodoncia. 4 ed. Caracas: Ed. Científica y técnica 1992: 607-630.
44. Lanza RP. *Principles of tissue engineering*. Austin: AP, 1997.
45. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *Journal of Endodontics*. 1992;18(12):625–627.
46. Lindhe J, Karring T, Lang N. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica, ed Panamericana, 4ª edición.
47. Lindhe J, Karring T, Araújo M. Anatomía del Periodonto. En: Lindhe, Karring y Land editores. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Buenos Aires. Argentina. Médica Panamericana. 4ª ed. 2005: 3 -50.
48. Loe, H. y Schiott,CR. (1970). The effect of mouth rinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research*, 5(2), 79-83.
49. Malanchuk VA, Gorshevikova EV, Kopchak AV. Antimicrobial action of ozone in the treatment of mandibular fracture. *Klin Khir*. 2000;(3):43-6.
50. Mehra P, Clancy C, Wu J. Formation of a facial hematoma during endodontic therapy. *J Am Dent Assoc* 2000;131:67-71.
51. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*. 1998;31(1):1–7.

52. Morrison B, DDS, Stephanie Sidow, DDS, Kathleen Mc Nally, DDS, James McPherson, PhD, and Augustine Chuang, PhD. An *In Vitro* Evaluation on the Growth of Human Periodontal Ligament Fibroblasts after Exposure to a 4-META- containing Methacrylate-base Endodontic Sealer. Joen.2011.02.026
53. Murray PE. Stem Cell responses in tooth regeneration. *Stem Cells Dev* 2004; 13:255-62.
54. Neaverth EJ, Swindle R. A serious complication following the in advertent injection of sodium hypochlorite outside the root canal system. *Compendium* 1990; 11:474, 476,478-81.
55. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of Endodontics*. 2004;30 (11):778–781.
56. Nair R. Apical Periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontology* 2000.1997;13:121-148.
57. Nelson T J, Behfar A, Terzic A. Strategies for therapeutic repair: The “R3” regenerative medicine paradigm clinical and translational. *Science* 2008; 1 (2):168-171.
58. Ng RP-Y. Sterilization in root canal treatment: current advances. *Hong Kong Dental Journal* 2004; 1:52-57.
59. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques J. Ozone therapy in medicine and dentistry. *Journal of Contemporary Dental Practice*. 2008;9(4):75–84.
60. Ohazama A. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004; 83:518-22.

61. Pontes F, Pontes H, Adachi P, Rodini C, Almeida D, Pinto. Gingival and bone necrosis caused by accidental sodium hypochlorite injection instead of anaesthetic solution. *Int Endod J* 2008;41:267-70.
62. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts type I, II and III colagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75: 871-5.
63. Rickard GD, Richardson R, Johnson T, McColl D, Hooper L. Ozone therapy for the treatment of dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(3):CD004153.
- Ruiz Liard. *Anatomia Humana*. Tercera Edición. Volumen 2. 1997.
64. Sanz,M., Newman,MG., Anderson,L., Matoska,W., Otomo-Corgel,J., y Saltini,C. (1989). Clinical enhancement of post-periodontal surgical therapy by a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse. *Journal of Periodontology*, 60(10), 570-576.
65. Schilder, H. (1974) "Cleaning And Shaping The Root Canal" *Dent. Clin. North America*, 18:269-296 n 2005,3-50.
66. Schiott, CR., Briner, WW., Kirkland, JJ., y Loe, H. (1976a).Two years oral use of chlorhexidine in man. III. Changes in sensitivity of the salivary flora. *Journal of Periodontal Research*, 11(3), 153-157.
67. Schiott,CR., Briner,WW., y Loe,H. (1976b). Two year oral use of chlorhexidine in man. II. The effect on the salivary bacterial flora. *Journal of Periodontal Research*, 11(3), 145-152.
68. Schiott,CR., Loe,H., Jensen,SB., Kilian,M., Davies,RM., y Glavind,K. (1970). The effect of chlorhexidine.
69. Smith Aj, Murray PE, Lumley PJ. Preserving the vital pulp in operative dentistry: 1.A biological approach. *Dent Update* 2002;29:64-9.



70. Spencer HR, Ike V, Brennan PA. Review: the use of sodium hypochlorite in endodontics potential complications and their management. *British Dental Journal* 2007; 202:555.
71. Treviño, DDS, Amol N. Patwardhan, MBBS, PhD, Michael A. Henry, DDS, PhD, Griffin Perry, BDS, Nicholas Dybdal-Hargreaves, Kenneth M. H argreaves, DDS, PhD, and Anibal Diogenes, DDS, MS, PhD. Effect of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla in a Platelet-rich Plasma Scaffold in Human Root Tips. *J Endodo* 2011;37:1109-1115.
72. Verfaillie, C. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology*. 2002; 12(11): 502-508.
73. Winrow,MJ. (1973). Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. *Journal of Periodontal Research*, 12(Suppl), 45-48.
74. Witton R, Brennan PA. Severe tissue damage and neurological deficit following extravasation of sodium hypochlorite solution during routine endodontic treatment. *Br Dent J* 2005;198:749-50.
75. Witton R, Henthorn K, Ethunandan M, Harmer S, Brennan PA. Neurological complications following extrusion of sodium hypochlorite solution during root canal treatment. *Int Endod J* 2005; 38:843-8.
76. Yamasaki A, Rose GG, Pinero GJ, Mahan CJ. Ultrastructural and morphometric analyses of human cementoblasts and periodontal fibroblasts. *J Periodontol* 1987, 58:192-201.
77. Zehnder M. Root canal irrigants. *Journal of Endodontics*. 2006;32(5):389–398.

