



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

Citotoxicidad *in vitro* de los irrigantes endodónticos hipoclorito de sodio 5%, gluconato de clorhexidina 2% y ácido etilendiaminotetraacético 17% sobre linfocitos humanos

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Cirujano Dentista

AUTORES:

Br. Castillo Alberca, Elia Yseli (ORCID: 0000-0002-3974-6833)

Br. Temoche Ipanaqué, Alma Mishelle Del Carmen (ORCID: 0000-0002-0573-8800)

ASESOR:

Dr. Mblgo. Ruiz Barrueto Miguel Angel (ORCID: 0000-0002-3373-4671)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

PIURA – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Dios porque a pesar de las pruebas siempre fue quien nos guío a seguir adelante para terminar y desarrollar nuestro trabajo hasta el final.

A mis Padres Gilmer Castillo y América Alberca a quien siempre admiro por ser una madre ejemplar y luchadora, quien es mi impulso y fue mi motivación para concluir esta etapa y siempre estuvo allí para guiar cada uno de mis pasos, ¡gracias por todo!

A mi hermana Elizabeth, a mis tíos Joba y Luis, y a cada miembro de mi familia por apoyarme para seguir adelante. Gracias por confiar en mí.

A Darwin Agurto por su apoyo, sus consejos y palabras para seguir adelante y no rendirme

Elia Y. Castillo Alberca

A mis hermanos Yanet, Karina y Jorsh por estar dispuestos siempre a apoyarme cuando más los necesitaba.

Alma Mishelle Temoche Ipanaqué

AGRADECIMIENTO

A nuestro asesor M.Sc. Mblgo. Miguel Angel Ruiz Barrueto, por compartir sus conocimientos y experiencia como asesor de este trabajo de investigación, desde que empezamos confió en nosotras hasta el final lo que nos dio luz para seguir y no desfallecer hasta el final.

Al Dr. Cesar Guzmán Vigo por su importante apoyo para la ejecución de esta investigación

A mis amigos Karen, Flor, Stephany, Miguel y Fiorella quienes compartieron a lo largo de la carrera universitaria en los malos y buenos momentos durante este largo camino.

A nuestros maestros que nos ayudaron en la formación profesional.

PÁGINA DEL JURADO

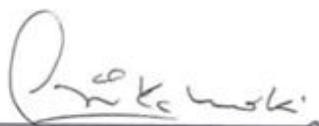
 UCV UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO	ACTA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	Código : F07-PP-PR-02.02 Versión : 09 Fecha : 23-03-2018 Página : 1 de 1
--	---------------------------------------	---

El Jurado encargado de evaluar la tesis presentada por: **CASTILLO ALBERCA ELIA YSELI** y **TEMOCHE IPANAQUE ALMA MISHELLE DEL CARMEN**, cuyo título es:

"CITOTOXICIDAD IN VITRO DE LOS IRRIGANTES ENDODÓNTICOS HIPOCLORITO DE SODIO 5%, GLUCONATO DE CLORHEXIDINA 2% Y ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO (EDTA) 17% SOBRE LINFOCITOS HUMANOS"

Reunido en la fecha, escuchó la sustentación y la resolución de preguntas por las estudiantes, otorgándoles el calificativo de: **13** (número) y **TRECE** (letras).

Piura, 26 de julio del 2019.



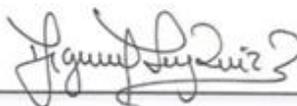
Dra. C.D. Erika Raquel Enoki Miñano

Presidente



Mg. C.D. Paul Martin Herrera Plasencia

Secretario



M.Sc. Mblgo. Miguel Angel Ruiz Barreto

Vocal



Elaboró	Dirección de Investigación	Revisó	Responsable del SGC	Aprobó	Vicerrectorado de Investigación
---------	----------------------------	--------	---------------------	--------	---------------------------------

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

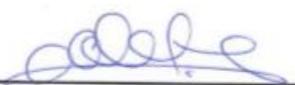
Nosotras, **Castillo Alberca Elia Yseli**, identificada con DNI N° 48351075 y **Temoche Ipanaqué Alma Mishelle Del Carmen**, identificada con DNI N° 41020229 estudiantes de la Escuela Profesional de Estomatología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo, presentamos la tesis titulada “**Citotoxicidad *in vitro* de los irrigantes endodónticos Hipoclorito de Sodio 5%, Gluconato de clorhexidina 2% y Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 17% sobre linfocitos humanos**” y Declaramos bajo juramento que:

1. La tesis es de nuestra autoría.
2. Hemos respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis tampoco ha sido autoplagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.
5. De identificarse algún tipo de fraude (datos falsos), plagio (información sin citar a autores), autoplagio (presentar como nuevo algún trabajo de investigación propio que ya ha sido publicado), piratería (uso ilegal de información ajena) o falsificación (representar falsamente las ideas de otros), asumimos las consecuencias y sanciones que de nuestra acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad César Vallejo.

Piura, 26 de julio del 2019



Castillo Alberca Elia Yseli
DNI N° 48351075



Temoche Ipanaqué Alma Mishelle Del Carmen
DNI N° 41020229



ÍNDICE

Carátula	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento	iii
Página del jurado	iv
Declaratoria de autenticidad	v
Índice	vi
Resumen	viii
Abstract.....	ix
I. Introducción.....	1
II. Método.....	12
2.1. Tipo y Diseño de investigación	12
2.2. Operacionalización de las variables	13
2.3. Población, muestra y muestreo (incluir criterios de selección).....	14
2.4. Técnicas e instrumentos de la recolección de datos, validez y confiabilidad	15
2.5. Procedimiento.....	15
2.6. Método de análisis de datos.....	17
2.7. Aspectos éticos	17
III. Resultados	18
IV. Discusión.....	22
V. Conclusiones	24
VI. Recomendaciones.....	25
Referencia.....	26
Anexos.....	30
Anexo 1. Ficha de recolección de datos.	30

Anexo 2. Validez y confiabilidad mediante prueba piloto.	31
Anexo 3. Prueba piloto.	34
Anexo 4. Materiales e insumos para experimentación.	36
Anexo 5. Procedimiento.	38
Anexo 6. Microfotografías de las láminas. Aumento 100 X.	43
Anexo 7. Análisis estadístico.....	44
Anexo 8. Autorización para uso de laboratorio.	46
Anexo 9. Acta de aprobación de originalidad de tesis.....	47
Anexo 10. Screenshot porcentaje de similitud del Turnitin.	48
Anexo 11. Autorización de publicación de tesis en repositorio institucional UCV.....	49
Anexo 12. Autorización de la versión final del trabajo de investigación.....	51

RESUMEN

La presente investigación fue de tipo experimental. Se evaluó el grado de Citotoxicidad *in vitro* de los irrigantes endodónticos Hipoclorito de Sodio al 5%, Gluconato de Clorhexidina al 2% y EDTA al 17% sobre linfocitos humanos. El procedimiento consistió en la preparación de un cultivo celular *in vitro* de linfocitos humanos el cuál fue expuesto a las sustancias de los irrigantes durante un tiempo determinado (15 minutos). Una vez realizada la experimentación se procedió a procesar la muestra hasta la obtención de láminas con las células expuestas a las sustancias químicas. Las láminas fueron teñidas independientemente con Giemsa, Orceína acética y azul de Cresilo. La evaluación de las láminas se realizó por microscopía óptica. Las características celulares observadas fueron colocadas en una ficha de recolección de datos que posteriormente fueron analizadas con el paquete estadístico Spss v.24. Los resultados demuestran que el Hipoclorito de sodio al 5%, obtuvo el mayor grado de citotoxicidad, seguido del Gluconato de clorhexidina al 2% y, el EDTA al 17% es el menos citotóxico. La viabilidad celular es menor en Hipoclorito de Sodio al 5%, que el Gluconato de clorhexidina al 2% y al EDTA al 17% comparados con el grupo control. Se concluye que la citotoxicidad del Hipoclorito de sodio al 5%, es superior a la del Gluconato de clorhexidina al 2%, y al EDTA al 17%.

Palabras claves: citotoxicidad, genotoxicidad, irrigantes, linfocitos, *in vitro*.

ABSTRACT

The present investigation was of experimental type. The degree of in vitro cytotoxicity of endodontic irrigators was evaluated 5% Sodium Hypochlorite, 2% Chlorhexidine Gluconate and 17% EDTA on human lymphocytes. The procedure consisted in the preparation of an in vitro cell culture of human lymphocytes which was exposed to the irrigant substances for a determined time (15 minutes). Once the experimentation was carried out, the sample was processed until obtaining sheets with the cells exposed to the chemical substances. The sheets were stained independently with Giemsa, Acetic Orcein and Cresyl Blue. The evaluation of the sheets was carried out by optical microscopy. The cellular characteristics observed were placed in a data collection form that were later analyzed with the statistical package Spss v.24. The results show that 5% sodium hypochlorite obtained the highest degree of cytotoxicity, followed by 2% chlorhexidine gluconate, and 17% EDTA is the least cytotoxic. Cell viability is lower in 5% Sodium Hypochlorite, than 2% chlorhexidine Gluconate and 17% EDTA compared to the control group. It is concluded that the cytotoxicity of 5% sodium hypochlorite is superior to 2% chlorhexidine gluconate and 17% EDTA.

Keywords: cytotoxicity, genotoxicity, irrigators, lymphocytes, in vitro.

I. INTRODUCCIÓN

En el campo de la endodoncia existen agentes responsables del proceso de la irrigación, sustancias químicas que se utilizan junto a una correcta instrumentación mecánica; los cuales poseen diferentes propiedades que determinarán el éxito o fracaso del tratamiento endodónticos. Dichas sustancias fueron estudiadas por diferentes especialistas con la finalidad de brindar los mejores beneficios de la salud de las personas. ¹ En la práctica diaria son usados para diluir restos pulpares y necróticos, su utilización tiene como función limpiar las paredes de los conductos y la destrucción de bacterias. Así también se tiene por conocimiento que causan citotoxicidad, repercuten en la viabilidad, producen lesión a nivel celular causando efectos desfavorables en los tejidos dentales.² En las últimas décadas a nivel internacional, han reportado dichas causas de las diferentes concentraciones de los irrigantes endodónticos como es el Hipoclorito de Sodio, Clorhexidina y EDTA, han causado controversia en relación a sus efectos tóxicos en diferentes autores.³

Así mismo a nivel regional y nacional en la actualidad no hay investigaciones que determinen la citotoxicidad de los irrigantes endodónticos, esto se debe porque no se han desarrollado nuevas investigaciones, ya sea por la falta de carencias para la realización de dicho estudio o por desconocimiento de los posibles efectos tóxicos de estas sustancias sobre las células. Por lo tanto, debido a que existen varias investigaciones hemos asumido el rol a través de la presente investigación, demostrar las alteraciones y el daño que producen a nivel oral ya que como futuras profesionales es nuestro deber aportar nuevos conocimientos.

En ese respecto, Ravinathanan, et al ³ (2018) en India, en su investigación "Cytotoxicity Evaluation of Combination Irrigant Regimens, with MTAD on Two Different Cell Lines". Siendo el objetivo la evaluación de la citotoxicidad de los regímenes de combinación en líneas celulares mediante el ensayo de azul de Tripán. Metodología, se utilizó las siguientes combinaciones (2% CHX + 2.5% NaOCl), CHX con cetrimida (CTR) (2% CHX + 0.5% CTR) y CHX con dodecil sulfato de sodio (2% CHX + 1% SDS). El 0,9% de solución salina normal (NS) y además el Biopure MTAD (100%) que sirvió de control. La evaluación citotóxica se da en líneas celulares de fibroblastos gingivales humanos (HGF) y en Henrietta Lacks (HeLa) a través del ensayo con "azul tripano" con treinta microlitros de la suspensión celular con 20 µl de irrigantes, ésta suspensión celular se llevó a la cámara de Neubauer. El recuento de células en microscopio, luego se expresa

en porcentaje de viabilidad. Como resultado la combinación de NS y 2% CHX + 0,5% CTR presentó mayores puntuaciones de viabilidad en las dos líneas celulares. El 2% de CHX + 1% SDS presenta mejor viabilidad con HeLa, pero eran gravemente citotóxicos con HGF. El 2% de CHX + 2.5% de NaOCl y MTAD, cuyo resultado muy citotóxico en HeLa. Se concluye que la variación en los datos se atribuye a la diferencia en la composición de la membrana celular y al mecanismo de acción y el régimen de combinación CHX al 2% + CTR al 0.5% presenta una citotoxicidad en forma más baja que la de MTAD.

Liu, et al⁴ (2018) en EE.UU. Investigó, “Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate, on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts”. Su objetivo fue investigar efectos *in vitro* de Chx en fibroblastos primarios como también en mioblastos y los osteoblastos. La metodología consiste que las células se exponen a diluciones de Chx en varios porcentajes (0%, 0,002%, 0,02%, 0,2% y 2%) la supervivencia celular a través del ensayo de citotoxicidad llamado cell counting kit-8. Y la migración celular por el ensayo de rasguño en una monocapa celular después de la exposición a Chx, y se mide el tiempo hasta el cierre del rasguño. Resultado, las células expuestas a diluciones de Chx de $\geq 0.02\%$ mostró tasas de supervivencia menores al 6% en relación a los controles no tratados ($p < 0.001$). Y las células expuestas en dilución de Chx del 0,002% tuvieron tasas de supervivencia significativamente más bajas en relación con el control ($p < 0,01$), se mostró una supervivencia celular del 96,4% ($p = 0,78$). Las células expuestas a diluciones de Chx $\geq 0.02\%$ tenían defectos de rasguño que permanecieron abiertos en forma indefinida. En conclusión, la concentración de Chx (2%) detiene en forma permanente la migración celular y reduce significativamente la supervivencia de fibroblastos, de los mioblastos y los osteoblastos *in vitro*.

Karkehadadi, et al⁵ (2018) en Irán. Investigaron, “Cytotoxicity of Endodontic Irrigants Human Periodontal Ligament Cells”. Su propósito consistió en aclarar implicaciones toxicas de NaOCl 5,25%, del Edta 17%, Mtad, Chx 2% en los tejidos periapicales y periodontales. Metodología la evaluación se hizo en el ligamento periodontal humano cultivado, se extrajo el tercio medio de las raíces premolares. La citotoxicidad se evaluó a través del ensayo tetrazolio de mosmann (MTT). La intensidad del color se relacionó con el % de células viables. En sus resultados el % medio de células viables observados fue significativamente diferente de los grupos de solución salina estéril en todos los puntos

temporales, y el porcentaje medio de las células viables. En conclusión, Mtad presentó citotoxicidad baja en cuanto al NaOCl, Chx, Qmix y Edta.

Singh, et al⁶ (2018) en India. Realizaron el estudio; “Comparative evaluation of cytotoxic effects of MTAD and sodium hypochlorite, using lactate dehydrogenase and trypan blue assays: An in vitro study”, un estudio *in vitro* el cual tuvo como objetivo examinar los efectos citotóxicos de BioPure MTAD y tres concentraciones clínicas de soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) (1%, 3% y 5%) en células cultivadas de ligamento periodontal humano (PDL). Materiales y métodos: Se cultivaron células PDL humanas en placas de cultivo celular y se pusieron en contacto con diversas concentraciones de irrigantes probados. La citotoxicidad tanto de BioPure MTAD como las diferentes concentraciones de NaOCl. Se estudiaron diferentes parámetros de toxicidad, como el ensayo de lactato deshidrogenasa y el ensayo de exclusión de colorante azul tripán, junto con cambios morfológicos en todos los diferentes puntos temporales. Las zonas medias de inhibición se calcularon para cada grupo y se analizaron estadísticamente. Resultados: BioPure MTAD fue el menos tóxico de todos los irrigantes. El 5% de NaOCl mostró la máxima citotoxicidad en intervalos de tiempo a corto plazo. Conclusiones: BioPure MTAD mostró una toxicidad mínima y las tres concentraciones (1%, 3% y 5%) de NaOCl mostraron efectos citotóxicos sobre las células PDL.

Blattes G. et al⁷ (2017) en Brazil “Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants, an in vitro and in vivo study”. Se analizó la citotoxicidad *in vitro* en fibroblastos 3T3 cultivados y observar reacción inflamatoria *in vivo* en ratas con soluciones de hipoclorito de calcio (Ca (OCl)₂) comparándolas con las soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl). El diseño de los fibroblastos 3T3 cultivados y expuestos en diferentes concentraciones de (Ca (OCl)₂) y soluciones de NaOCl, mediante un ensayo de rasguño. Se analizó la tasa de viabilidad con el ensayo de azul de tripano, estas soluciones de concentraciones de 1% , 2.5% se inyectaron en el tejido subcutáneo en 18 ratas Wistar macho de 18 semanas de edad. Las muestras fueron analizadas en un microscopio de luz. Los resultados del ensayo de rasguño, el Ca (OCl)₂ no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo de control .Las soluciones de concentraciones de NaOCl y Ca (OCl)₂ del 0,0075% y 0,005% obtuvo resultados parecidos con los del grupo de control en el ensayo de azul de tripano. En el ensayo *in vivo*, el grupo de Ca (OCl)₂ al 1% mostró una disminución significativa de los neutrófilos.

El Ca (OCl) 2 mostró resultados de viabilidad favorable con respuesta inflamatoria de bajo nivel. El Ca (OCl) 2 presentó una citotoxicidad así como biocompatibilidad aceptables como una solución irrigante.

Nocca, et al⁸ (2017) en Italia. “Chromographic Analysis and cytotoxic effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite reaction mixtures. journal of endodontics” Su objetivo fue investigar estabilidad de PCA (paracloroanilina) en presencia de NaOCl y examinar los efectos citotóxicos in vitro de las mezclas de reacción de CHX / NaOCl. Metodología consistió en que agregaron varios volúmenes de NaOCl a CHX (mezcla 1) o PCA (mezcla 2). Después de la centrifugación, se analizó las fracciones de sobrenadante y del precipitado que fueron recogidas de las muestras con la utilización cromatografía líquida de alto rendimiento y la citotoxicidad de ambas fracciones se examinaron en el ligamento periodontal humano y en las líneas celulares de fibroblastos. En su resultado el análisis cromatográfico de líquidos de alto rendimiento no mostró señal de PCA cuando el NaOCl se mezcló con CHX (mezcla 1). En la segunda mezcla la intensidad de PCA disminuyó cuando se añadió NaOCl a PCA, y también se observaron señales cromatográficas parecidas a la CHX / NaOCl. La mortalidad en ambas líneas celulares y mezcla de reacción CHX / NaOCl demuestra una amplia gama de los efectos citotóxicos.

Narges F. Et al⁹ (2016) en Iran, “Evaluation of cytotoxic effects of various endodontic irrigation solutions on the survival of stemcell of Human Apical Papilla”. La metodología consistió en las células aislados de terceros molares mandibulares impactados inmaduros, colocados en placas de 24 recipientes, se dividieron en 6 grupos experimentales y se expusieron a MTAD, Q Mix, 17% EDTA, 2% de clorhexidina, 5.25% de NaOCl, salina estéril y un grupo control. La citotoxicidad se evaluó con el ensayo metiltiazol tetrazolio (MTT). Resultados: disminución de la viabilidad de todos los grupos experimentales, diferencia significativa de los grupos control y solución salina estéril. La citotoxicidad de la sustancia más alta a la más baja fue la siguiente: MTAD > EDTA > QMax = NaOCl > CHX > solución salina estéril. Conclusión: La clorhexidina tuvo citotoxicidad más baja que el EDTA, MTAD, QMix y NaOCl.

Cabral-Romero et al¹⁰ (2016), en México. “Efectos citotóxicos de gluconato de clorhexidina en células epiteliales” Su objetivo fue la de evaluar la citotoxicidad de la CHX sobre cultivo de la línea celular HeLa. Su metodología consistió en determinar citotoxicidad de la CHX a través del ensayo de viabilidad celular MTT. Y el daño al ADN

genómico por el ensayo del cometa. En sus resultados determinaron 0.72% de células viables representando una toxicidad severa. El ensayo del cometa fue positivo a CHX, dañó el ADN de células HeLa y mostrando la estela clásica de un cometa al mismo tiempo que el control positivo de daño al ADN, se detectó que la CHX puede llevar a la destrucción de la célula, para determinar la citotoxicidad se utilizó una sola concentración (0.12%), el número de células vivas fue determinado mediante el ensayo de MTT. Los resultados indicaron que 99.28% de las células no sobrevivieron a la exposición de la clorhexidina, impidiendo su crecimiento y división celular demostrando alto efecto citotóxico sobre las células epiteliales Hela. En conclusión, la CHX al 0.12% posee toxicidad severa.

Botton, et al¹¹ (2016) en Brazil, “Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth.” Se evaluó la citotoxicidad in vitro de soluciones de irrigación y asociaciones farmacológicas utilizadas en la pulpectomía de dientes primarios. En su metodología la viabilidad celular (MTT), la peroxidación lipídica (TBARS), el ensayo del cometa alcalino y las pruebas de GEMO se realizaron para evaluar la citotoxicidad del hipoclorito de sodio (1% y 2,5%), clorhexidina al 2%, ácido cítrico al 6% y 17 % De EDTA, células mononucleares de sangre periférica humana (MTT, TBARS y ensayo de cometa alcalino). Se estableció nivel de significación en $P < 0.05$. Los resultados fueron que todas las soluciones de irrigación y asociaciones farmacológicas redujeron la viabilidad celular. Todos los grupos causaron daños en el ADN cuando se evaluaron mediante el ensayo del cometa alcalino, todos los grupos causaron daño por dsDNA ($P < 0.05$). Resultados nivel de toxicidad de las soluciones, la clorhexidina presentó menos potencial citotóxico. El EDTA fue el menos citotóxico de las soluciones irrigantes.

Vouzara T. et al¹² (2015) en Grecia. “Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine”. El Objetivo consistió en evaluar la capacidad de los irrigantes del conducto radicular de uso común para inducir efectos citotóxicos, cuando se aplican individualmente o en combinación. En cuanto a su metodología el MRC5 células se cultivaron como cultivos monocapa a 37 ° C. Las células se enfrentaron a hipoclorito de sodio , al (EDTA 17%), clorhexidina y sus combinaciones (NaOCl 2,5% / EDTA 17%, NaOCl 2,5% / CHX 2%, EDTA 17% / CHX 2%) en diluciones seriadas, se usó un grupo control. Su resultado fue que los irrigantes probados fueron citotóxicos de manera dependiente de la dosis. CHX fue el irrigante más citotóxico analizado, seguido de NaOCl 2,5%, mientras que el EDTA17% fue el irrigante menos

citotóxico analizado. La diferencia entre CHX 2% y NaOCl 2,5% fue significativa ($P < 0.05$), así como entre NaOCl 2,5% y EDTA 17% ($P < 0.05$). En conclusión, la CHX 2% fue significativamente más citotóxico que NaOCl 2,5% y EDTA 17%. El NaOCl 2,5% fue significativamente más citotóxico que el EDTA 17%.

Quiñones P.¹³ (2015) en México. “Efecto citotóxico de hipoclorito de sodio y EDTA sobre células madre de pulpa dental”. Objetivo evaluar efecto de citotoxicidad de NaOCl y EDTA en células madre de pulpa dental in vitro. Metodología se utilizó células madre de pulpa dental; para la evaluación de la citotoxicidad se usó EDTA en concentraciones 1.7%, al 1%, 0.5% y al 0.1%; el NaOCl al 0.25%, al 0.15%, al 0.1% y al 0.5%. NaOCl y EDTA se incubaron con las células a 37° C. También el grupo control incubados con células. Los resultados demostraron alta toxicidad del NaOCl frente a las células, la combinación del NaOCl con el EDTA no disminuyó el efecto citotóxico en las células, la combinación de edta 1% + NaOCl 05%, presentó un ligero aumento en la viabilidad celular y las concentraciones de EDTA fueron menos tóxicas. Resultados el NaOCl presentó alta citotoxicidad en todas las concentraciones, EDTA presentó mayor viabilidad utilizándose al 0.5% ,0.10% además la mezcla del EDTA y la del NaOCl fue menos citotóxica en su concentraciones del 0.1% y 0.5% respectivamente.

Bajrami, et al¹⁴ (2014) en Turquía, “Cytotoxic effect of endodontic irrigants in vitro”. Objetivo del estudio fue evaluar el efecto citotóxico del NaOCl al 3%, CHX 2% y MTAD en fibroblastos del ligamento periodontal de rata, a 0,1 y 100 $\mu\text{l} / \text{mL}$ a través del método colorimétrico WST-1. Metodología, se utilizó fibroblastos de ligamentos de rata se expuso a irrigantes luego se evaluó su viabilidad. Se utilizó el ensayo WST-1, utilizando un lector de micro ELISA. Resultados el hipoclorito de sodio, CHX Y MTAD fueron fuertemente citotóxico en células de fibroblastos del ligamento periodontal de rata, cuyos efectos fueron dependientes de la dosis. La CHX al 2% fue más citotóxica que los otros dos irrigantes. Para la dilución de 100 $\mu\text{l} / \text{ml}$ de cada irrigante a la hora, la CHX fue menos citotóxico mientras que el hipoclorito fue el más citotóxico.

La irrigación, se define como la eliminación cuidadosa de los remanentes de la pulpa necrótica, de bacterias y las limaduras destinatarias de los conductos radiculares, también se define como el lavado para retirar residuos, agente bactericida, solvente de tejidos y además de lubricante.¹⁵ Así un complemento fundamental después de la instrumentación formando parte importante en el desbridamiento y desinfección radicular, la eficacia de

la irrigación depende de la amplitud del conducto, cantidad de líquido empleado y el calibre de la aguja.¹⁶

Su finalidad es eliminar restos pulpares, de restos necrosados o nichos de bacterias, disminuir, humedecer las paredes dentinarias para facilitar el mecanismo de los instrumentos, remover el barro dentinario o llamado “smear layer”^{17,18}. Las soluciones irrigantes deben llegar a la zona más apical de los conductos, deben llevarse al interior del conducto por medio de agujas finas calibres de 27 o 30 para evitar el efecto del émbolo, ya que al disolver los restos pulpares no origina bloqueos ya que irriga después de cada instrumento.¹⁷ Debe ser alternado permitiendo la producción de la reacción química y liberación de oxígeno, favoreciendo de esta manera el arrastre del respectivo material orgánica e inorgánica y finalmente se aspira su contenido y se complementa con puntas de papel absorbente.¹⁹

Dentro de las propiedades del irrigante ideal esta la baja tensión superficial a menor tensión va a facilitar el flujo de la solución, éste tendrá mejor permeabilidad al acceder a los túbulos dentinarios y conductos. Su efecto Bactericida, produce muerte a bacterias, su PH es alcalino y su acción disolvente, para remanentes del tejido pulpar vital y necrótico para su posterior eliminación. No es irritante ni tóxico para los tejidos vitales del periodonto. Tiene acción de limpieza. Tiene acción lubricante ayuda al deslizamiento los instrumentos.¹⁹

Dentro de los inconvenientes del NaOCl debe aplicarse lentamente en el canal, evitar extrusión forzada más allá del foramen apical, evitando introducir a presión al conducto con agujas de aplicación de punta cerrada con orificio lateral y minimizar riesgos potenciales durante su uso y que sin embargo se debe terminar con EDTA o clorhexidina para evitar una alteración a la unión del sellador a la dentina.²¹ Los irrigantes se clasifican en compuestos halogenados: Solución de Hipoclorito de sodio al 0.5 % (Solución de Dakin), la Solución de Hipoclorito de Sodio al 1% (Solución de Milton, la Solución de Hipoclorito de Sodio al 2.5% (solución de Labarreque) y la Solución de Hipoclorito de Sodio al 4-6% (soda clorada doblemente concentrada); Solución de Gluconato de Clorhexidina al 2%. Y también se clasifica en quelantes que son soluciones de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), entre otras soluciones tenemos el agua destilada esterilizada, el suero fisiológico.²²

El hipoclorito de sodio es una sal formada químicamente por el ácido hipocloroso y el hidróxido de sodio, presenta propiedades oxidantes, es hipertónico y muy

alcalino; su pH es de 11 a 12. Además de ser un potente germicida que ejerce acción antibacteriana.²³ Su fórmula $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} = \text{Na OH} + \text{HOCl}$, es hipertónico (288mOsmol/kg) además es muy alcalino de pH=11 a 12; por lo que neutraliza la acidez del medio y también evita el desarrollo de las bacterias. Su mecanismo de acción según Estrela; los mecanismos son tres: Saponificación, Neutralización y Cloraminización.¹ Los factores que modifican el hipoclorito de sodio es la concentración, cada una la está indicada para tratamientos de conductos radiculares en dientes vitales y necrosis pulpar sin lesión apical.²⁴

Los quelantes son compuestos que tienen la capacidad de fijar los iones metálicos. Este poder se debe a numerosas ligaduras químicas que su molécula establece con un mismo ion del metal como modo para retenerlo del medio. Son sustancias ácidas que sustraen iones de calcio de dentina, además reblandecen las paredes y favorecen la limpieza.²² El Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA), fue introducido como una solución irrigadora en 1957 por Nadar Obsta, siendo las más usadas las que presentan concentración del 17% con un pH de 5 o 7.¹⁴ Por lo tanto se alterna la irrigación con NaOCl y ablandador de dentina EDTA.²⁵

El Gluconato de clorhexidina es un agente antimicrobiano eficaz, además de poseer acción antimicrobiana en amplio espectro, sustentividad, y una falta relativa de toxicidad. La clorhexidina tiene actividad microbiana muy eficaz horas después de la instrumentación.²⁶ El hipoclorito de sodio tiene la misma eficacia, pero no es agente antimicrobiano sustantivo. Se utiliza comúnmente al 0.12% o 2%, tiene propiedades antibacterianas. En bajas concentraciones actúa como bacteriostático y en altas como bactericida.^{27, 28} En cuanto a su estructura química la Clorhexidina (CHX), es denominada biguanida catiónica, porque está formada por 2 anillos simétricos 4 -clorofenólicos, como también por dos grupos biguanida unidos por un puente central de hexametileno, y con dos cargas positivas a cada extremo del puente.^{29, 30}

Dentro de sus propiedades esta la acción antimicrobiana, sustentividad y baja Toxicidad. Dentro de su mecanismo de acción en bajas concentraciones las sustancias de bajo provocan el efecto bacteriostático. En altas concentraciones tiene efecto bactericida por la precipitación y coagulación del citoplasma. Al ser bacteriostática (interfiere en los sistemas bacterianos rompen la pared celular) o bactericida.^{32, 33} El Ácido cítrico es orgánico utilizado como irrigante final porque elimina el barrillo dentinario en asociación con el

hipoclorito de sodio, y a la vez permeabilizar los túbulos dentinario y efecto antimicrobiano. No es una sustancia químicamente activa que posea efectos antimicrobianos, es capaz de remover la capa de barrillo dentinario barriendo a los microorganismos que se encuentran en el conducto radicular. Elimina el barrillo dentinario y es capaz de destruir del conducto radicular partículas firmemente adheridas a las paredes del conducto radicular. En tres minutos actúa descalcificando las paredes del conducto.³⁴

La citotoxicidad es la descripción de la medida de la capacidad destructiva o de exterminación de un agente. Ésta palabra se utiliza con mayor frecuencia para describir el carácter de actividad inmune o de la toxicidad de determinados fármacos que limitan el desarrollo de células cancerosas.³⁵ Las pruebas *in vitro* son un sistema efectivo para la evaluación de la toxicidad de rutina de muchos compuestos y elemento valioso para determinar su efecto sobre la proliferación celular. Son relativamente simples, rápidas y de bajo costo, proporciona evaluación valiosa sobre sustancias que deberían ser descartadas. El aislamiento, propagación y caracterización de poblaciones celulares se destaca como la principal metodología para iniciar la caracterización *in vitro* de compuestos vocativos.³⁶

Las pruebas *in Vitro* sobre cultivos de células, tienen como objetivo principal medir la citotoxicidad, evalúa sobre el cambio celular, su morfología, y la actividad metabólica. En los cultivos celulares también se evalúa la citotoxicidad de un material de acuerdo a la liberación de sus componentes, los cambios que generan sobre las células, ayudando a identificar qué componentes del material pueden ser tóxicos, y en qué concentraciones.³⁷

Los efectos tóxicos producen daño o anomalías nucleares como micronúcleos, células binucleadas, y cromátida condensada, además de células muertas o degeneradas, rotura o pérdida de cromosomas.³⁸ Las células sin este tipo de daño presentan núcleos definidos, intactos y abundante citoplasma. Cuando hay presencia de citotoxicidad durante la mitosis hay fragmentación nuclear, de puentes citoplasmáticos que pueden conducir a micronúcleos que consiste en la aparición de más de un núcleo. Éstos están compuestos por fragmentos cromosómicos que no se incorporaron a los núcleos hijos durante la mitosis. La célula binucleadas es la que presenta dos núcleos dentro de una célula de tamaño similar. La cromátida condensada representa etapas de la apoptosis donde los núcleos presentan un patrón estriado de tractos paralelos de comatina.³⁹ La *carriorexis* se caracteriza por agregación de la cromatina nuclear, las células con cromatina condensada tienen un patrón

moteado nuclear indicativo de la fragmentación nuclear. El núcleo lobulado es la prolongación nuclear o con constricción con proceso de eliminación del material nuclear.⁴⁰

El linfocito que es un tipo de leucocito en adultos humanos, los linfocitos representan aproximadamente del 20 al 40 por ciento del número total de glóbulos blancos. Se encuentran en la circulación y también se concentran en los órganos y tejidos linfoides centrales, como el bazo, amígdalas y los ganglios linfáticos.⁴¹ Son predominantes en la fase del ciclo celular, se distinguen dos tipos principales de linfocitos, a saber, las células T y las B, son las células T, en su mayoría los que se estimulan a sufrir mitosis *in vitro* con fitohemaglutinina.⁴² Son los ganglios linfáticos órganos inmunológicos vitales, dentro de su anatomía y de su función crear un lugar muy eficaz y eficiente para la vigilancia de antígenos, de producir linfocitos, secreción de anticuerpos y la filtración de la linfa.⁴³

Estos miden 7–8 μm y los grandes de 12–15 μm de diámetro. El linfocito tiene una pequeña cantidad de citoplasma, un núcleo redondo y liso, el 15 al 25% de los linfocitos son células B y el 40 al 75% son células T.⁴⁴ Mientras que las células B produce anticuerpos del sistema inmunológico que combate sustancias extrañas los antígenos. Las células T ayudan a controlar la respuesta inmune.⁴⁵ Las células B y T, ambas células poseen en su superficie externa moléculas que entran en contacto con entidades antigénicas. En los órganos linfoides los linfocitos B interactúan con antígenos de la membrana de la membrana de células dentríticas foliculares, estos antígenos ingresan a través de la piel y son drenados hacia los ganglios linfáticos y los que ingresan por vía sanguínea se unen a los linfocitos B. Los linfocitos T periféricos reconocen antígenos propios. El sistema inmune posee la capacidad de reconocer moléculas antigénicas o inmunogénica que entre al organismo, por lo tanto, debe poseer un repertorio de linfocitos que lleven en sus superficies receptores (BCR) reconocen antígenos solubles (TCR) reconocen antígenos peptídicos.⁴⁶

En la presente investigación se planteó la interrogante ¿Cuál es el grado de Citotoxicidad *in vitro* de los irrigantes endodónticos Hipoclorito de Sodio 5%, Gluconato de clorhexidina 2% y Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 17% sobre linfocitos humanos? La hipótesis que responden a priori este problema fue: Los irrigantes hipoclorito de Sodio al 5%, Gluconato de clorhexidina 2% y EDTA 17% son moderadamente citotóxicos sobre linfocitos humano.

Esta investigación se justifica porque los irrigantes endodónticos se usan desde muchos años atrás en los tratamientos endodónticos y son utilizados comúnmente para uso clínico como es el Hipoclorito de Sodio, Gluconato de clorhexidina y EDTA en sus diferentes concentraciones. Actualmente son considerados citotóxico y vienen siendo punto de controversia entre diversos autores.^{6,11,13} Mientras no exista un producto natural que no produzca daños a los tejidos orales éstos se seguirán utilizando en forma indiscriminada en diferentes concentraciones altamente citotóxicas.

En nuestro medio, no se han encontrado antecedentes de estudios sobre citotoxicidad de los irrigantes endodónticos en estudiantes de pregrado, sin embargo, existen antecedentes que demuestran resultados negativos a nivel celular y lo demuestran a través de diversos métodos de ensayo, cultivos y sus consecuencias a nivel de la viabilidad celular.

El propósito de la presente investigación fue evaluar sobre la citotoxicidad y las alteraciones en los linfocitos de éstos irrigantes a través de ensayos *in vitro*, porque actualmente no hay o existe una solución irrigadora ideal y lo que se desea es que estos tampoco sean agresivos a nivel del tejido dental. Así mismo, aporta información necesaria, ampliar los niveles de conocimiento y servirá como base a nuevos estudios.

Para dar solución al problema de investigación se planteó el objetivo general; determinar la Citotoxicidad de los irrigantes endodónticos Hipoclorito de Sodio al 5%, Gluconato de clorhexidina al 2% y EDTA al 17% sobre linfocitos humanos *in vitro*. Y los objetivos específicos, evaluar la Citotoxicidad del hipoclorito de sodio al 5% sobre linfocitos humanos *in vitro*. Evaluar la Citotoxicidad de la clorhexidina al 2% sobre linfocitos humanos *in vitro* y evaluar la Citotoxicidad del el EDTA al 17% sobre linfocitos humanos *in vitro*.

II. MÉTODO

2.1. Tipo y Diseño de investigación

El estudio fue de corte transversal porque según Hernández-Sampieri, por los resultados fueron recolectados en un solo momento (en un solo tiempo).⁴⁷

El diseño de nuestra investigación fue experimental ya que se manipuló intencionalmente la variable independiente. Fue de enfoque cuantitativa.⁴⁷

2.2. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Citotoxicidad	La citotoxicidad es la descripción de la medida de la capacidad destructiva o de exterminación de un agente.	Alteración estructural que experimentan los linfocitos humanos al ser expuestos a sustancias o materiales químicos y cuya intensidad va a depender del tiempo de exposición y la cantidad de material.	Numero ce células Anomalías celulares	Viabilidad celular Alteraciones celulares.	De razón
Irrigantes endodónticos	La irrigación, se define como la eliminación cuidadosa de los remanentes de la pulpa necrótica, de microbios y las limaduras destinadas de los conductos radiculares, también se define como el lavado para retirar residuos, agente bactericida, solvente de tejidos y además de lubricante	Se utiliza para el lavado y desinfección del sistema de conductos, eliminación de los restos contenidos en la cámara pulpar y/o conductos radiculares	Hipoclorito de sodio (NaOCl) ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) Gluconato de clorhexidina (CHX)	5% 17% 2%	De razón

2.3. Población, muestra y muestreo (incluir criterios de selección)

Población

La población está constituida por el número de unidades de análisis, que son en total 40 láminas (10 láminas para grupo control, 10 láminas para Hipoclorito de sodio 5%, 10 láminas para Gluconato de clorhexidina 2% y 10 láminas para EDTA 17%).

Muestra

La muestra será igual que la población. El número de unidades de ensayo fueron 40 láminas procesadas.

Siendo que por cada lámina se observarán un total de 200 células por cada grupo expuesto lo que hace un total de 800 células observadas.

Cálculo del tamaño de la muestra

El número de replicados se determinó aplicando la siguiente fórmula estadística aplicable en investigaciones experimentales que determina el número mínimo de observaciones, duplicados y repeticiones.

$$n = \frac{w - w^2 \cdot Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha}^2}{W^2}$$

$$n = \frac{0,80 - 0,80^2 \cdot 0,842 + 1,4 \cdot 1,96^2}{0,80^2}$$

$$n = \frac{0,80 - 0,64 \cdot 0,842 + 1,4 \cdot 3,8416}{0,64}$$

$$n = \frac{0,16 \cdot 0,842 + 1,4 \cdot 3,8416}{0,64}$$

$$n = \frac{0,13472 + 5,37824}{0,64}$$

$$n = 5,51296$$

$$0,64$$

$$n = 9$$

Donde,

n = Número mínimo de réplicas que deben efectuarse en el estudio.

$Z\alpha$ = nivel de confianza asignado.

$Z\beta$ = potencia asignada a la prueba.

W = Diferencia mínima observable.

Así, $Z\alpha = 1.96$; $Z\beta = 0.842$; $W = 0.80$ (80%). Reemplazando la ecuación se obtuvo que el número mínimo de replicados es 9.

2.4. Técnicas e instrumentos de la recolección de datos, validez y confiabilidad

2.4.1. Técnicas

El presente estudio fue realizado a través de la técnica experimentación y observación.

2.4.2. Instrumento de recolección de datos

El instrumento fue una ficha de recolección de datos, creada por las investigadoras donde se colocaron los datos recolectados en las observaciones de cada una de las unidades de ensayo.

2.5. Procedimiento

2.5.1. Obtención de sangre periférica

La muestra de sangre periférica para los cultivos celulares fue tomada de un paciente de sexo femenino, de 25 años. Sin diagnóstico de enfermedades recientes ni consumo de fármacos durante los últimos tres meses. La muestra de sangre fue tomada, en el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo, Piura. La superficie de la mesa fue limpiada con paño húmedo y desinfectada con alcohol de 70°. Sobre la superficie desinfectada se colocó un campo estéril y sobre el cuál se colocaron los materiales para la extracción que consistieron en jeringas hipodérmicas, alcohol, algodón, gasa y ligadura.

Para la extracción, una jeringa hipodérmica de 10 mL fue heparinizada con heparina sódica estéril, dejando unos 0,05 mL dentro de la jeringa (hasta la altura del embolo) en condiciones de esterilidad. Se colocó la ligadura en el brazo. A 10 cm aproximadamente del lugar de la extracción. Se palpó el área donde se realizó la punción para ubicar la vena. Con una torunda de algodón embebida en alcohol de 70° se procedió a realizar la desinfección de la zona del antebrazo para la extracción sanguínea. Realizamos la punción teniendo cuidado de usar la aguja con el bisel hacia arriba y con la jeringa con los números hacia arriba también. De este modo se controló la cantidad de sangre extraída la cuál fue de 10 mililitros de sangre venosa. Una vez alcanzada la cantidad de sangre se retiró la ligadura y se extrajo la aguja y jeringa. Se presionó la zona de punción con un algodón seco y sobre él se colocó una gasa estéril sujetada con esparadrapo. La aguja utilizada para la heparinización y la extracción sanguínea será desechada adecuadamente en el contenedor de residuos biológicos.

2.5.2. Cultivo y procesamiento de linfocitos humanos

En condiciones de esterilidad. Se sembrarán 15 gotas de sangre con la heparina en un tubo cónico con 5 mL de medio de cultivo PBMAX para cultivo de linfocitos. Se invertirá el tubo de dos a tres veces suavemente para evitar la hemólisis. Una vez realizada la inoculación, los cultivos se incubarán en estufa a 37°C durante 70 horas. Después del tiempo de incubación se incorporó a cada tubo 0.1 ml de Colchicina a una concentración final de 0.08 µg/mL. Una vez aplicada la colchicina se continuó con la incubación a 37 °C durante dos horas más, con lo cual se completaron las 72 horas de incubación que establece el método. Y se les aplicó la concentración de los irrigantes a evaluar. El tiempo de exposición fue de 15 minutos después de los cuales se realizó el procesamiento. Fueron tres grupos experimentales y un grupo control de crecimiento.

Una vez completado el tiempo de incubación se realizó el procesamiento del cultivo para su evaluación. Los cultivos fueron centrifugados a 1000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se le incorporó 1 ml solución hipotónica con el cual se resuspendió el sedimento obtenido. Después se le adicionó 3 ml más y se llevó a incubación a 37°C durante 8 min. Después de la incubación se resuspendió el sedimento adicionándole 0,5 ml de

fijador carnoy. Luego centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos. Este pasó se repitió tres veces más. El sedimento fue llevado a refrigeración a 4°C durante 60 minutos. Una vez cumplido el tiempo de refrigeración se realizaron dos lavados y fijados adicionales. Después se realizó el goteado en láminas inclinadas refrigeradas previamente. Las láminas preparadas fueron secadas en estufa a 37° C durante 4 horas y después teñidas con colorante Wright y orceina acética. Una vez preparadas las láminas fueron analizadas en microscopía óptica con microscopio Olympus CX21 y el software LAZES 3.2 de Leica Mycrosistem.

2.5.3. Reporte de resultados

La citotoxicidad se clasificó según la viabilidad celular en comparación con el control. Las diferentes categorías de viabilidad celular fueron las descritas por Dahl,¹⁴ et al. Según el siguiente detalle: No citotóxico (> 90 %), ligeramente citotóxico (60 – 90 %), moderadamente citotóxico (30 – 59 %) y fuertemente citotóxico (<30 %).

2.6. Método de análisis de datos.

Los resultados fueron tabulados en el programa Excel y, analizados en paquete estadístico Spss v.24. Se realizó análisis de Varianza (ANOVA) para verificar si existen diferencias significativas del grado de citotoxicidad entre los grupos, y la prueba de Tukey para comprobar diferencias individuales entre estos. Además, se aplicaron técnicas descriptivas, tablas de distribución de frecuencia para conocer los niveles de citotoxicidad.

2.7. Aspectos éticos

La donante de la muestra de sangre periférica firmó un consentimiento informado (Anexo). En dicho consentimiento informado se explican los motivos de la obtención de la muestra de sangre. Así mismo, todas las muestras biológicas e insumos químicos utilizados en la presente investigación fueron inactivados y eliminados adecuadamente a fin de disminuir su potencial de riesgo contaminante o infeccioso.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Comparaciones múltiples de la citotoxicidad *in vitro* de los irrigantes endodónticos hipoclorito de sodio 5%, gluconato de clorhexidina 2% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 17% sobre linfocitos humanos.

COMPARACIONES MÚLTIPLES						
Variable dependiente	Irrigantes endodónticos	Irrigantes endodónticos	Sig.	95% de intervalo de confianza		
				Límite inferior	Límite superior	
Alteración celular	Grupo Control	Hipoclorito de Sodio 5%	,918	-,3614	,4014	
		Clorhexidina 2%	,000	-5,0814	-4,3186	
		EDTA 17%	,000	-2,7014	-1,9386	
	Hipoclorito de Sodio 5%,	Grupo Control	Hipoclorito de Sodio 5%	,918	-,4014	,3614
			Clorhexidina 2%	,000	-5,1014	-4,3386
			EDTA 17%	,000	-2,7214	-1,9586
		Clorhexidina 2%	Grupo Control	,000	4,3186	5,0814
			Hipoclorito de Sodio 5%	,000	4,3386	5,1014
			EDTA 17%	,000	1,9986	2,7614
			Grupo Control	,000	1,9386	2,7014
	EDTA 17%	Hipoclorito de Sodio 5%,	,000	1,9586	2,7214	
		Clorhexidina 2%	,000	-2,7614	-1,9986	
		Grupo Control	,000	,85	,99	
	Viabilidad celular	Grupo Control	Hipoclorito de Sodio al 5%	,000	,85	,99
Clorhexidina 2%			,000	,37	,51	
EDTA 17%			,000	,09	,23	
Hipoclorito de Sodio 5%,		Grupo Control	Hipoclorito de Sodio al 5%	,000	-,99	-,85
			Clorhexidina 2%	,000	-,55	-,41
			EDTA 17%	,000	-,83	-,69
		Clorhexidina 2%	Grupo Control	,000	-,51	-,37
			Hipoclorito de Sodio 5%,	,000	,41	,55
			EDTA 17%	,000	-,35	-,21
			Grupo Control	,000	-,23	-,09
EDTA 17%		Hipoclorito de Sodio 5%,	,000	,69	,83	
		Clorhexidina 2%	,000	,21	,35	
		Grupo Control	,000	,69	,83	

Fuente: Análisis estadístico de datos.

Se observa en viabilidad celular la diferencia significativa $< a 0.05$ de las sustancias irrigantes hipoclorito de sodio 5%, gluconato de clorhexidina al 2% y EDTA al 17% lo que indica que cada sustancia tiene diferente grado de citotoxicidad respecto al grupo control, y en cuanto a alteraciones celulares cuando se compara al grupo control con el hipoclorito al 5% se observa que no hay diferencia significativa pero cuando se compara el grupo control con el gluconato al 2% y EDTA al 17% si existe diferencia significativa.

Tabla 2. Comparación de la citotoxicidad *in vitro* del irrigante endodóntico hipoclorito de sodio 5% con el control negativo.

GRUPOS	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite superior	Límite inferior
ALTERACIONES CELULARES						
Grupo Control	200	,0200	,14035	,00992	,0004	,0396
Hipoclorito de Sodio al 5%,	200	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000
VIABILIDAD CELULAR						
Grupo Control	200	1,00	,000	,000	1,00	1,00
Hipoclorito de Sodio al 5%,	200	,08	,272	,019	,04	,12

Fuente: Análisis de datos estadísticos.

En la tabla 2 se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) cuando se compara hipoclorito de sodio 5% con el grupo control. Esto se observa para las características de citotoxicidad denominada alteraciones celulares y viabilidad celular. Estadísticamente se observa que no hay diferencia significativa, pero esto se debe a que las células fueron completamente destruidas por el hipoclorito por lo que las dos condiciones de citotoxicidad celular no se lograron identificar pues no existían células que evaluar.

Tabla 3. Comparación de la citotoxicidad *in vitro* del irrigante endodóntico Gluconato de clorhexidina al 2% con el control negativo.

GRUPOS	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite superior	Límite inferior
ALTERACIONES CELULARES						
Grupo Control	200	,0200	,14035	,00992	,0004	,0396
Gluconato de clorhexidina al 2%	200	4,7200	3,66178	,25893	4,2094	5,2306
VIABILIDAD CELULAR						
Grupo Control	200	1,00	,000	,000	1,00	1,00
Gluconato de clorhexidina 2%	200	,56	,498	,035	,49	,63

Fuente: Base de datos estadísticos.

En la tabla 3 se observa que el Gluconato de clorhexidina al 2% tiene efecto citotóxico estadísticamente significativo ($p < 0,05$) cuando se compara con el grupo control. Esto se observa para las características de citotoxicidad denominada alteraciones celulares y viabilidad celular. Esto significa que la clorhexidina logra generar más daño celular en las células expuestas.

Tabla 4. Comparación de la citotoxicidad in vitro del irrigante endodóntico EDTA AL 17% con el control negativo.

Grupos	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite superior	Límite inferior
ALTERACIONES CELULARES						
Grupo Control	200	,0200	,14035	,00992	,0004	,0396
EDTA al 17%	200	2,3400	1,29335	,09145	2,1597	25,203
VIABILIDAD CELULAR						
Grupo Control	200	1,00	,000	,000	1,00	1,00
EDTA al 17%	200	,84	,368	,026	,79	,89

Fuente: Base de dato estadísticos.

En la tabla 4 se observa que el EDTA al 17% tiene efecto citotóxico estadísticamente significativo ($p < 0,05$) cuando se compara con el grupo control. Esto significa que el EDTA al 17% genera daño celular observado mediante alteraciones celulares e inhibición de la viabilidad celular

IV. DISCUSIÓN

Los irrigantes endodónticos, son sustancias químicas ampliamente utilizado en endodoncia. Normalmente son compuestos altamente tóxicos por lo cual deben ser utilizadas en concentraciones relativamente bajas debido a los efectos celulares que podría causar cuando no se manipula correctamente. La presente investigación evaluó el grado de citotoxicidad *in vitro* de los irrigantes endodónticos Hipoclorito de Sodio al 5%, Gluconato de clorhexidina al 2% y EDTA al 17% sobre linfocitos humanos. Los resultados mostraron que el Hipoclorito de Sodio tiene grado de citotoxicidad superior a la de la clorhexidina al 2%, y éste al EDTA al 17%. Todos los resultados fueron comparados con un control de crecimiento normal de las células. En ese sentido, Liu, et al⁶ (2018) demostró que la clorhexidina en las concentraciones de 0%, 0,002%, 0,02%, 0,2% y 2% tiene efecto citotóxico en la supervivencia celular *in vitro* de fibroblastos, de los mioblastos y los osteoblastos. Esta investigación se relaciona con la realizada por nosotros, pues se llegó a demostrar cierto grado de citotoxicidad del gluconato de clorhexidina al 2%. Si bien es cierto Liu, et al evaluó la citotoxicidad sobre células diferentes a los linfocitos, si evaluaron la misma concentración 2%.

Así mismo, Singh, et al⁷ (2018) en India en su estudio demostró que el hipoclorito de sodio en su concentración del 5% sobre células cultivadas de ligamento periodontal humano demostraron la máxima citotoxicidad. Estos resultados se relacionan a nuestra investigación donde se observa que los linfocitos al ser expuestos el irrigante hipoclorito al 5% causa la muerte de éstos en un 98%. Por su parte Ravinanthanan, et al³ (2018), demostró la citotoxicidad de la clorhexidina (CHX) al 2% y al combinarla con NaOCl al 2,25%. Demostraron que es altamente citotóxico. También realizaron las combinaciones de al 2% + 1% NS (salina normal) + 0,5% CTR (cetrimida), resultó citotóxico y la combinación de CHX al 2% + NaOCl al 2,5% y MTAD resultaron gravemente citotóxicos, todos ellos sobre líneas células HGF y HELA. Según éstos resultados la clorhexidina en combinación siempre va contribuir en efectos negativos altamente citotóxicos. Karkehadadi, et al⁵ (2018), evaluó la citotoxicidad de NaOCl 5,25%, EDTA17%, MTAD, CHX 2% y QMix (Ácido etilendiaminotetraacético 17% + clorhexidina 2%, y como detergente bromuro de cetiltrimetilamonio) reportando que el EDTA 17% era el más citotóxico que los otros irrigantes. Estos resultados contrastan con los obtenidos en la presente investigación. Pues según el estudio realizado, la sustancia más citotóxica fue el

hipoclorito de sodio al 5%. Y esto se relaciona y fundamenta con los resultados obtenidos por Nocca, et al⁸ (2017) y Blattes, et al⁷ (2017) quien analizó la citotoxicidad in vitro en comparando la citotoxicidad del hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) con el de hipoclorito de sodio NaOCl 2.5%, demostrando ambos alta citotoxicidad. Mientras que EDTA ocupó el tercer lugar de daño celular. Lo que se interpreta como una citotoxicidad baja.

Cabral, et al¹¹ (2016), encontró que la clorhexidina al 0.12% posee citotoxicidad severa a baja concentración y produce destrucción de la célula; en nuestro estudio al utilizar la concentración más alta se exhibe más su alto efecto citotóxico. Independientes de las diferencias respecto al tipo de célula expuesta y a los métodos utilizados se puede observar que dichos resultados se correlacionan con los obtenidos en la presente investigación. También Narges, et al⁹ (2016) demostró que el MTAD > EDTA 17% > QMix y NaOCl 5.25% > CHX 2% y difieren con lo reportado por Bajrami, et al¹⁴ (2014), quien demostró que la clorhexidina al 2% fue mayor que el MTAD y NaOCl en fibroblastos del ligamento periodontal. Por su parte Botton, et al¹¹ (2016) explicó que el EDTA al 17% presenta menor citotoxicidad al compararlo al resto de irrigantes.

Del mismo modo Vouzara, et al¹³ (2015) encontró que la clorhexidina fue significativamente más citotóxica que NaOCl y EDTA. Dichos resultados contrastan con los obtenidos en la presente investigación pues en este caso la clorhexidina ocupó el segundo lugar por debajo del hipoclorito respecto a la citotoxicidad que genera. Bajrami, et al¹⁴ (2014), en sus estudios sobre los efectos citotóxicos del NaOCl al 3%, CHX al 2%, MTAD en células de fibroblastos del ligamento periodontal de rata, dio como resultados la existencia de efectos citotóxicos de todos los mencionados, pero la CHX fue altamente perjudicial en la viabilidad celular y fue más citotóxico que los otros dos irrigantes. Éste estudio nos indica el alto nivel de citotoxicidad de la CHX al 2% más que el NaOCl al 3%, esto explicaría que a mayor concentración del químico mayor grado de citotoxicidad.

V. CONCLUSIONES

1. De los irrigantes endodónticos evaluados el más citotóxico fue hipoclorito de Sodio al 5%, seguido de Gluconato de clorhexidina al 2% y finalmente EDTA al 17%.
2. El hipoclorito de sodio al 5% es fuertemente citotóxico sobre linfocitos humanos en cultivo *in vitro*.
3. El gluconato de clorhexidina al 2% es moderadamente citotóxico sobre linfocitos humanos en cultivo *in vitro*.
4. El Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 17% es ligeramente citotóxico sobre linfocitos humanos en cultivo *in vitro*.

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la citotoxicidad de los irrigantes endodónticos sobre otros tipos de cultivos celulares.
2. Evaluar el efecto citotóxico de irrigantes endodónticos sobre distintos tipos de cultivos celulares, pero considerando diferentes tiempos de exposición y más de una concentración de las sustancias químicas.
3. En base a los resultados obtenidos evaluar el grado de genotoxicidad de los irrigantes endodónticos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

REFERENCIA

1. Estrela C., Barbin EL, Spanò JC, Marchesan M, de Pècora j. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz dent J*. 2002.
2. Soares I, Goldberg F. *Endodoncia técnicas y fundamentos*. Argentina: Panamericana; 2003.p
3. Ravinathanan M, Hegde M, Shetty V, Kumari S. Cytotoxicity Evaluation of Combination Irrigant Regimens with MTAD on Two Different Cell Lines. *Contemp Clin Dent*. 2018 abril-junio; 9 (2): 255–259.
4. Liu JX, Werner J, Kirsch T, Zuckerman JD, Virk MS. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Jt Infect* 2018; 3 (4): 165-172. doi: 10.7150 / jbj.26355. Disponible en: <http://www.jbj.net/v03p0165>.
5. Karkehabadi H, Yousefifakhr H, Zadsirjan S. Cytotoxicity of Endodontic Irrigants on Human Periodontal Ligament Cells. *Irán endod J*. 2018; 13 (3) p 390–394.
6. Singh A, Kakkar P, Pant A. Comparative evaluation of cytotoxic effects of MTAD and sodium hypochlorite using lactate dehydrogenase and trypan blue assays: An in vitro study. *Saudi Endod J* 2018; 8: 189-95
7. Blattes G., Mestieri L., Böttcher D., Medeiros A., Montagner F., “Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants: An in vitro and in vivo study” Brazil. 2017
8. Nocca G, Ahmed H, Martorana G, Callà C, Gambarini G, Rengo S, Spagnuolo G, Martorana G, Callà C, Gambarini G, Rengo S, Spagnuolo G. Chromographic Analysis and Cytotoxic Effects of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite Reaction Mixtures. *Journal of endodontics*. 2017. 43(9), p1545–1552.
9. Narges F, Eshaghali S, Hamed K. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Irán endod J*. 2016. 11 (4): p 293–297.
10. Cabral-Romero C, Hernández-Delgadillo R. Efectos citotóxicos de gluconato de clorhexidina en células epiteliales. *Revista Mexicana de Estomatología* 3(1) E 2016
11. Botton G, Pires CW, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IBM, Sagrillo MR. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. Brazil. 2016

12. Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides E. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine.. Revista.2015. 49 (8).
13. Quiñones P .“efecto citotóxico de hipoclorito de sodio y EDTA sobre células madre de pulpa dental [Tesis] México: universidad Autónoma de Nuevo León,Facultad de Odontología.2015
14. Bajrami D, Hoxha V, Gorduysus O , Muftuoglu S , Zeybek N Küçükaya S. Cytotoxic effect of endodontic irrigants in vitro. Journal List Med Sci Monit Basic Res .20.2014; 20: 22–26.
15. Gomez de ferraris M, Campos Núñez. Histología, embriología e ingeniería tisular Bucodental, España: panamericana .2010.
16. Sthephen Cohen,Kenneth M.Hargreaves. Vías de la pulpa .9na edición .2008. Editorial Elseiver. España.
17. Ingle J. Endodoncia. McGraw Hill - Interamericana. México . 5a ed 2004.
18. Ok E, Adanir N, Hakki S. Comparison of cytotoxicity of various concentrations organum extract solution with 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite. Eur J Dent [serie en línea] 2015 [citado 2019 28 de mayo]; 9: 6-10. Disponible en: <http://www.eurjdent.com/text.asp?2015/9/1/6/149630>
19. Rodríguez A. Endodoncia consideraciones actuales . Ponce. Amolca. Primera edición. Venezuela. 2003.
20. Leonardo MR. Endoncia tratamiento de conductos radiculares. .Artes Mèdicas Latinoamericana. Panamericana .Brasil.1. 2005
21. Manual de odontologia de basica integrada .segunda edicion.colombia.editorial Bookmarketing LTda.pag.313
22. Canalda C. Brau E. Endododoncia técnicas clínicas y bases científicas.Masson. 2da ed. España. 2006. p 188
23. Sundaram D, Narayanan RK, Vadakkepurayil K. A Comparative Evaluation on Antimicrobial Effect of Honey, Neem Leaf Extract and Sodium Hypochlorite as Intracanal Irrigant: An Ex-Vivo Study. J Clin Diagn Res. 2016;10(8):ZC88–ZC91. doi:10.7860/JCDR/2016/19268.8311
24. Teixeira PA, Coelho MS, Kato AS, Fontana CE, Bueno CE, Pedro-Rocha DG. Cytotoxicity assessment of 1% peracetic acid, 2.5% sodium hypochlorite and 17% EDTA on FG11 and FG15 human fibroblasts. Acta Odontol Latinoam. 2018 Jun;31(1):11-15. Disponible en : <http://www.scielo.org.ar/pdf/aol/v31n1/v31n1a02.pdf>
25. James L. Gutman - Paul E.Lovdahl Solucion de problemas. Quinta edición. editorial elseiver .Pag 370

26. George J, Klika AK, Higuera CA. Use of Chlorhexidine Preparations in Total Joint Arthroplasty. *Journal Bone Jt Infect.* 2017;2(1):15–22. Published 2017 Jan 1. Disponible en : doi:10.7150/jbji.16934
27. Gunnar Bergen holtz .Preben Horseted –Binddslev,Claes Reit . Endodoncia diagnóstico y tratamiento de la pulpa dental.Manual Moderno.2007.Mexico
28. Chen, H., Shi, Q., Qing, Y. et al. J. Cytotoxicity of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate on primary cultured human gingival fibroblasts.,*Huazhong .Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical Sciences.*2016 (36): 137. <https://doi.org/10.1007/s11596-016-1556-0>
29. Mahmoud tarabinejad-richard e. walton endodoncia principios y practica .4ta edicion..editorial elseiver. pag 372
30. Salimi A, [Alami B](#), Pourahmad J. Analysis of cytotoxic effects of chlorhexidine gluconate as antiseptic agent on human blood lymphocytes.*J Biochem Mol Toxicol.* 2017 Aug;31(8). doi: 10.1002/jbt.21918.
31. American Dental Association, *Terapeutica dental.* Masson.2da edición .España .2003.Pag 211.
32. Sperandio, C., et al. (2008). Response of the periapical tissue of dogs teeth to the action of citric acid and EDTA. *Journal of Applied Oral Science* 16 Pp. 59-63
33. Lopez, S, et al (2006). Effect of CHX on the decalcifying effect of 10% citric acid, 20% citric acid or 17% EDTA. *JOE* 32(8). Pp 781-784
34. J. Olmos Fassi, M.A. del Carril, S. Saguir, A. García Rusco; Limpieza de las paredes del conducto usando una combinación de hipoclorito de sodio 2,5%, ácido cítrico 10% y clorhexidina 2% - ácido cítrico 10% . Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Odontología. Argentina. 27 (2). 2009
35. Mosby. *Diccionario de Odontología.* 2da Edicion.España.2009
36. Acevedo J , Santos J , , Rivera H , Petricevich V ,Nolasco N, Collí D, Jesús Santa-Olalla Tapia. in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos . *Revista OmniaScienceModelos Col.* Volcanes – Cuernavaca, Morelos, México. 2013
37. Buenahora T. Guzmán H. Biocompatibilidad y citotoxicidad nota científica. sociedad colombiana de operatoria y biomateriales. fundamentos de biocompatibilidad. *Revista o0 municieo*Recibido en Agosto 10 de 2007 - Aceptado en Octubre 6 de 2007.
38. Umang S. Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJPBS)* ISSN : 2278-3008 :[revista en linea] 2012 [consultado 18 mayo 2019];1, disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/48e3/11b8e478b646df1d7254e50918f43e15f667.pdf>

39. Yadav AS, Jaggi S Ensayo Cytome Micronucleus Bucal - Un biomarcador de genotoxicidad. Journal Mol Biomark Diagn. 2015 (6):236. Disponible en Doi:10.4172 / 2155-9929.1000236
40. Torres O,Ramos-Ibarra M. Utility Micronucleus Test and Nuclear Abnormalities in Exfoliated Cells of Oral Mucosa in the Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Damage.Int. J. Morphol. 2013 .(31).2.650-657 . <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200050>
41. Sirpa J. Salmi M. Lymphocyte Adhesion and Trafficking; in Clinical Immunology [revista en línea] 2019 [consultada 19 mayo 2019] 1. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/lymphocyte>
42. Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación respuesta a las emergencias radiológicas. organismo internacional de energía atómica. Austria. 2014
43. Yanes R, Gustafson C ,Weyand C ,Goronzy J . Lymphocyte generation and population homeostasis throughout life.Elseiver ;[revista en línea] 2017 [consultada 19 de mayo] 2; disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0037196316300877>
44. Ayodele E.The complete study of blood cells and peripheral blood film are important in laboratory medicine. Revista Americana de Medicina de Laboratorio. ;[revista en línea] 2016 [consultada 20 de mayo 2019] 1.acceso en: <http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/paperinfo?journalid=235&doi=10.11648/j.ajlm.20160103.12>
45. Silva J. "What are lymphocytes and what are healthy levels to have?." Medical News Today. MediLexicon. [revista en línea] 2018. [consultada en mayo 2019] acceso en Web:<https://www.medicalnewstoday.com/articles/320987.php>>
46. Ferreira A,Afani A,Lanza P. AguillonJ, Sepulveda Cecilia. Inmunologia Basica Y Clinica,Immlñ. Editorial Mediterranea .Chile. Pag 10
47. Hernández R. Metodología de la investigación. sexta ed. McGraw-Hill. México .2014.
48. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Acta bioética 2013 .disponible en : <https://www.wma.net/es/polices-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>

ANEXOS

Anexo 1. Ficha de recolección de datos.

CÉLULAS	CITOTOXICIDAD HIPOCLORITO DE SODIO 5%			
	Binúcleos	Micronúcleos	Cromatina condensada	Viabilidad celular
1				
2				
3				
4				
5				
X ⁿ				

CÉLULAS	CITOTOXICIDAD CLORHEXIDIN 2%			
	Binúcleos	Micronúcleos	Cromatina condensada	Viabilidad celular
1				
2				
3				
4				
5				
X ⁿ				

CÉLULAS	CITOTOXICIDAD EDTA 17%			
	Binúcleos	Micronúcleos	Cromatina condensada	Viabilidad celular
1				
2				
3				
4				
5				
X ⁿ				

Anexo 2. Validez y confiabilidad mediante prueba piloto.

Descriptivos								
Cálculo de células en fase de mitosis								
INVESTIGADORAS - EXPERTO	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ALMA TEMOCHE	5	4,972 0	9,97392	4,4604 7	-7,4123	17,3563	,00	22,80
ELIA CASTILLO	5	5,140 0	8,84883	3,9573 2	-5,8473	16,1273	,40	20,90
MIGUEL RUIZ - EXPERTO	5	5,628 0	8,37310	3,7445 6	-4,7686	16,0246	,48	20,45
Total	15	5,246 7	8,42072	2,1742 2	,5834	9,9099	,00	22,80

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Cálculo de células en fase de mitosis			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
,063	2	12	,940

ANOVA

Cálculo de células en fase de mitosis					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,161	2	,581	,007	,993
Dentro de grupos	991,559	12	82,630		
Total	992,720	14			

2. Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples					
Variable dependiente: Cálculo de células en fase de mitosis					
				Sig.	95% de intervalo de confianza

(I) Analistas investigadoras - Experto	(J) Analistas investigadoras - Experto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar		Límite inferior	Límite superior	
HSD Tukey	ALMA TEMOCHE	ELIA CASTILLO	-,16800	5,74908	1,000	- 15,5058	15,1698
		MIGUEL RUIZ - EXPERTO	-,65600	5,74908	,993	- 15,9938	14,6818
	ELIA CASTILLO	ALMA TEMOCHE	,16800	5,74908	1,000	- 15,1698	15,5058
		MIGUEL RUIZ - EXPERTO	-,48800	5,74908	,996	- 15,8258	14,8498
	MIGUEL RUIZ - EXPERTO	ALMA TEMOCHE	,65600	5,74908	,993	- 14,6818	15,9938
		ELIA CASTILLO	,48800	5,74908	,996	- 14,8498	15,8258
DMS	ALMA TEMOCHE	ELIA CASTILLO	-,16800	5,74908	,977	- 12,6942	12,3582
		MIGUEL RUIZ - EXPERTO	-,65600	5,74908	,911	- 13,1822	11,8702
	ELIA CASTILLO	ALMA TEMOCHE	,16800	5,74908	,977	- 12,3582	12,6942
		MIGUEL RUIZ - EXPERTO	-,48800	5,74908	,934	- 13,0142	12,0382
	MIGUEL RUIZ - EXPERTO	ALMA TEMOCHE	,65600	5,74908	,911	- 11,8702	13,1822
		ELIA CASTILLO	,48800	5,74908	,934	- 12,0382	13,0142

Subconjuntos homogéneos

Cálculo de células en fase de mitosis			
Analistas investigadoras - Experto		N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
HSD Tukey ^a	ALMA TEMOCHE	5	4,9720
	ELIA CASTILLO	5	5,1400
	MIGUEL RUIZ - EXPERTO	5	5,6280
	Sig.		,993
Duncan ^a	ALMA TEMOCHE	5	4,9720
	ELIA CASTILLO	5	5,1400
	MIGUEL RUIZ - EXPERTO	5	5,6280
	Sig.		,915
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.			

Mediciones del índice mitótico realizado por las investigadoras y el experto. Los resultados indican que NO EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ($p > 0,01$) en todas las comparaciones, conclusión de que las mediciones en cada grupo son iguales. Esto indique que existe concordancia entre las mediciones de las investigadoras y el experto.

Anexo 3. Prueba piloto.

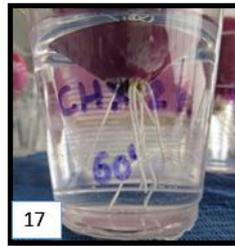
Crecimiento de los extremos apicales al quinto día de las raicillas



11



12



17



18



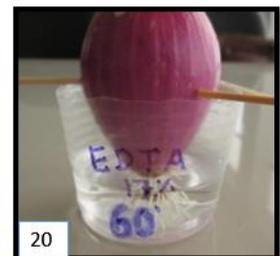
13



14



19



20



15



16

11. se coloca cada una de las soluciones irrigantes en los vasos. 12,13 y 14. Enfrentamiento de las raicillas de los bulbos de cebolla al hipoclorito al 5% (20, 40 y 60 min)

15 ,16 y 17. Enfrentamiento de las raicillas de los bulbos de cebolla a la Gluconato de clorhexidina al 2% (20, 40 y 60 min). 18, 19 y 20 Enfrentamiento de las raicillas de los bulbos de cebolla al EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 17% (20, 40 y 60 min).



21



22

21. Materiales para la tinción de las raicillas de los meristemas de cebolla.
22. Filtración de la orceina acética



23



24



25



26

23. Se cortan aproximadamente 1 cm de las raicillas de los meristemas y colocarlos en una luna de reloj.
 24. se adiciona orceina acética al material biológico (meristemas de cebolla)
 25. se calentó la orceina acética al mechero de alcohol depositada en la luna de reloj hasta la emisión de vapores (hasta 3 vapores) y dejar enfriar
 26. colocación de los meristemas a las láminas.



27



28

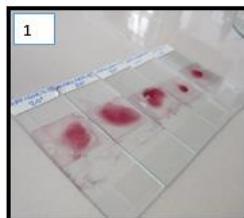
27. se Coloca una gota de colorante nuevo.
 28. se golpea con extremo de un lápiz de grafito a fin de obtener una extensión adecuada al preparado



29

29. se Realiza la técnica del squash presionando con el pulgar en el cubre objeto y eliminamos con un trozo de papel de filtro el exceso de colorante

Observación de las lámina a aumento (40x). Recuento de células.



1

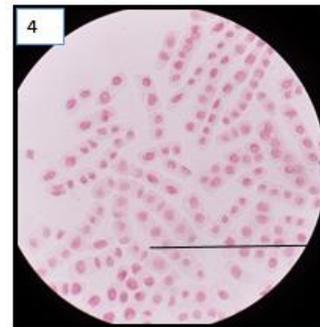


2

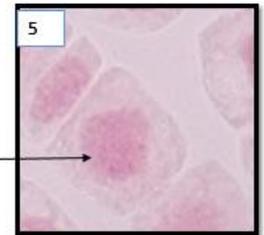


3

1. Se ordenan las laminas de acuerdo a los tiempos. 2 y 3. Observación de las fases de la mitosis. Hacemos un recuento de células.

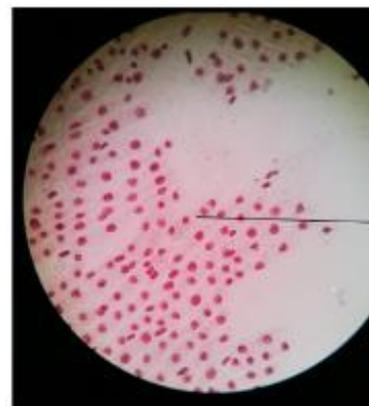


4

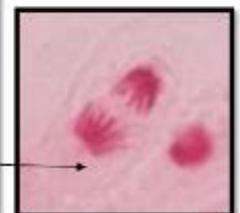


5

4 y 5 Observación de la célula en fase de profase.



Observación de la célula en fase de anafase.



Anexo 4. Materiales e insumos para experimentación.



1



2

1. Alcohol de 96
2. Agua estéril



3



4



5



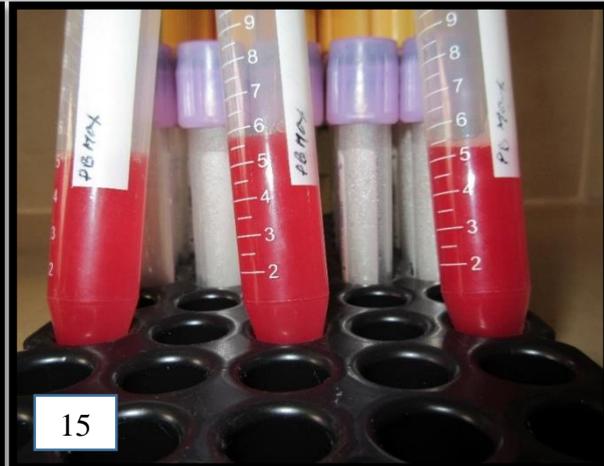
6

3. Tubos de ensayo.
4. Cápsulas de Colchicina.
5. Heparina Sódica (1 Vial).
6. Irrigantes: Hipoclorito de Sodio, Gluconato de Clorhexidina 2% y Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 17%.

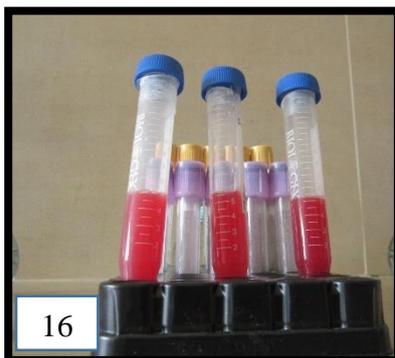


8. Ácido acético glacial.
9. Colorante para tinción Orceína
10 y 11. Colorante para tinción Giemsa y colorante azul de Cresilo.
11. Colorante para tinción Azul de Cresilo.

Anexo 5. Procedimiento.



12, 13, 14 y 15: Se sembró 15 gotas de sangre con heparina en un tubo cónico con 5ml de medio de cultivo para células.



16: Se agitó levemente hasta uniformizar. Realizar todo en condiciones de esterilidad.

17: Incubó el cultivo en estufa a 37°C por 70 horas.



18

18: Se procede a enfrentar con los irrigantes endodónticos.



19



21



22

21, 22 y 23: Se agregó los irrigantes a los cultivos



MAY 30 2019

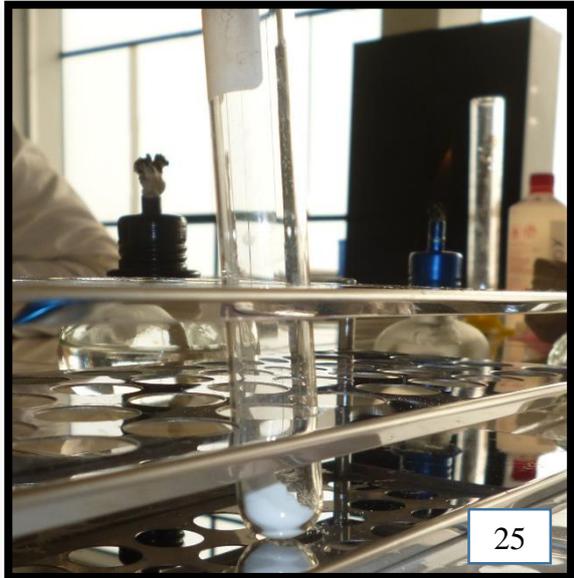
19 y 20: Se agregó los irrigantes a los cultivos



23



24



25

24. Pesaje de la colchicina.
25. Cantidad de colchicina.



26



28



27

26 y 27. Mesclado de la colchicina con el agua estéril
28. Incorporación de colchicina.

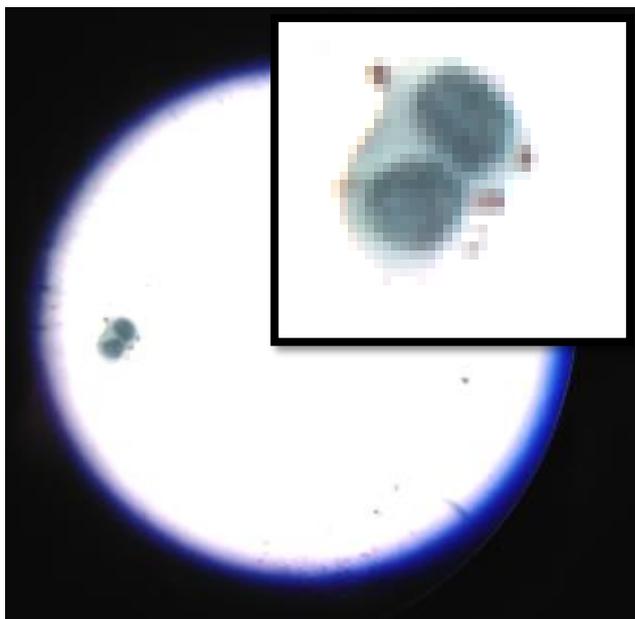


30. Se incubó nuevamente en estufa a 37° C por 2 horas.
31. Se filtró el tinte de coloración azul de Cresilo.
32. Laminas control.
33. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos.
34. Se eliminó el sobrenadante con un micropipeta.
35. Se incorporó una solución hipotónica. Primero 1 mL y se respondió, luego se adicionó 3 mL más y se llevó a estufa a 37 °C durante 8 minutos
36. Se resuspendió el material añadiéndole 5 mL de fijador Carnoy (3 – metanol +1-ácido acético).
37. Se eliminó el sobrenadante con un micropipeta. Se le fijó adicionándole 1 mL, se volvió a re suspender y luego se agregó 3mL mas de fijador de carnoy. Se centrifugó nuevamente a 1000 rpm por 5 min. Se adicionó nuevamente 1 mL de fijador de carnoy y luego 3 mL más, se resuspendió nuevamente con pipeta Pasteur.

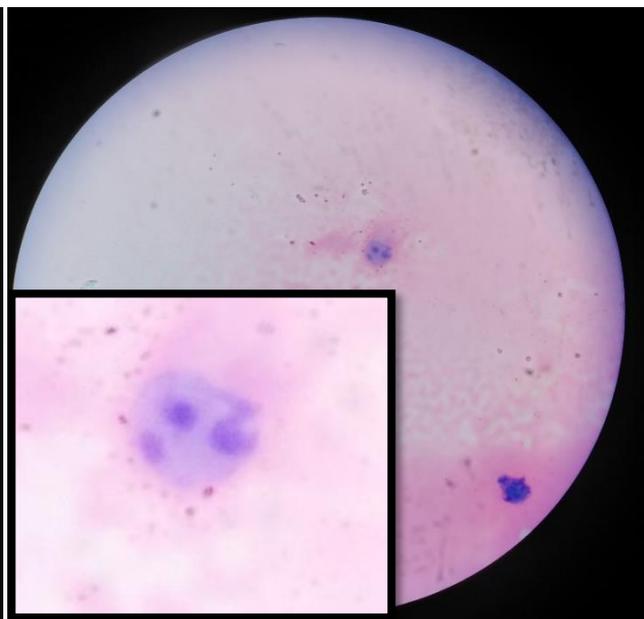


38. Láminas previamente refrigeradas. 39 y 40. Goteo a una altura de 20cm.
 41.42. Láminas de los irrigantes. 43. Laminas. 44. Tinción de las láminas.
 45. Tinción de las láminas. 46. Observación de las láminas.

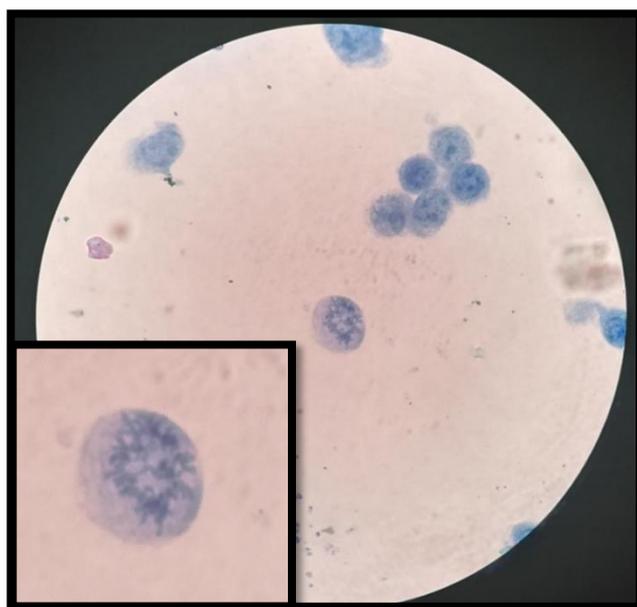
Anexo 6. Microfotografías de las láminas. Aumento 100 X.



Célula binucleada

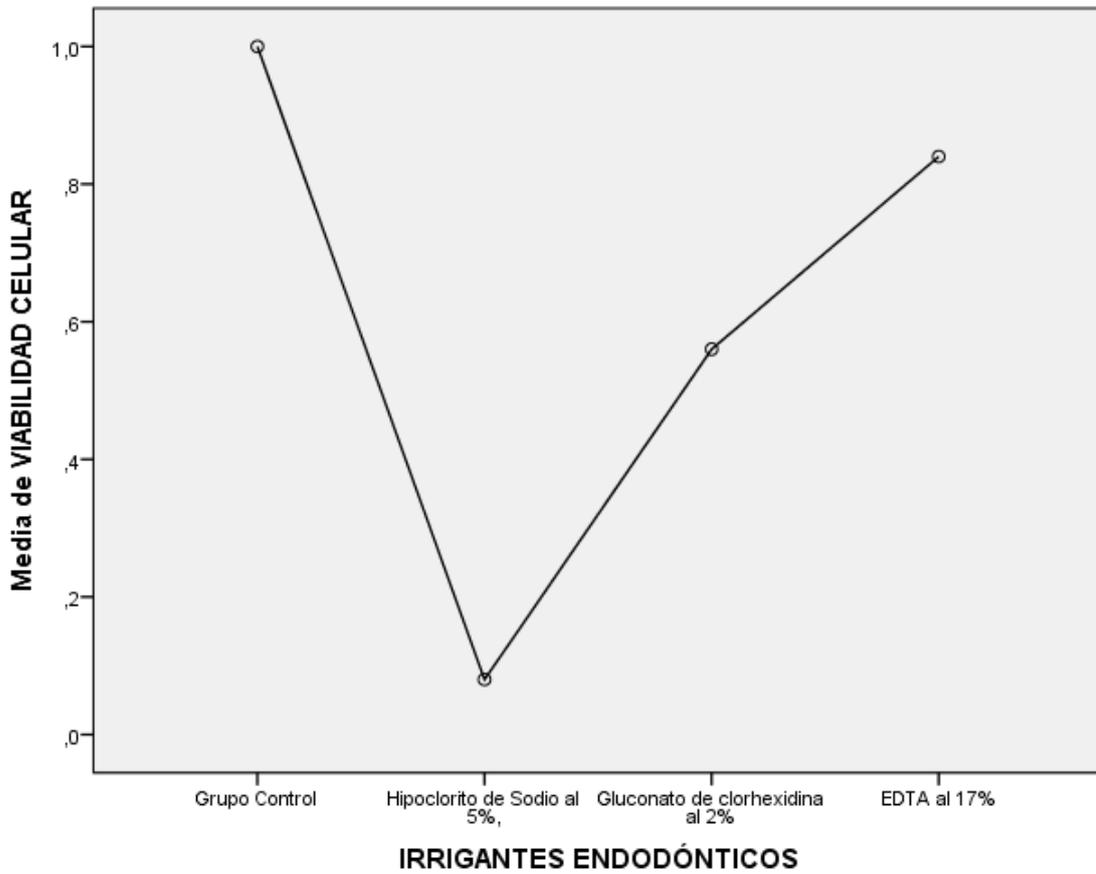


Célula con micronúcleos



Célula con cromatina condensada

Anexo 7. Análisis estadístico.



Los resultados obtenidos demuestran que la citotoxicidad del Hipoclorito de sodio al 5%, es superior a la de la clorhexidina al 2%, y al EDTA al 17%.

La viabilidad celular es menor en Hipoclorito de Sodio al 5%, el Gluconato de clorhexidina al 2% y el EDTA al 17% comparado con el grupo control.

Descriptivos								
VIABILIDAD CELULAR								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Grupo Control	200	1,00	,000	,000	1,00	1,00	1	1
Hipoclorito de Sodio al 5%,	200	,08	,272	,019	,04	,12	0	1
Gluconato de clorhexidina al 2%	200	,56	,498	,035	,49	,63	0	1
EDTA al 17%	200	,84	,368	,026	,79	,89	0	1
Total	800	,62	,486	,017	,59	,65	0	1

Prueba de homogeneidad de varianzas			
VIABILIDAD CELULAR			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
293,906	3	796	,000

ANOVA					
VIABILIDAD CELULAR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	97,600	3	32,533	284,953	,000
Dentro de grupos	90,880	796	,114		
Total	188,480	799			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: VIABILIDAD CELULAR						
DMS						
(I) IRRIGANTES ENDODÓNTICOS	(J) IRRIGANTES ENDODÓNTICOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Grupo Control	Hipoclorito de Sodio al 5%,	,920*	,034	,000	,85	,99
	Gluconato de clorhexidina al 2%	,440*	,034	,000	,37	,51
	EDTA al 17%	,160*	,034	,000	,09	,23
Hipoclorito de Sodio al 5%,	Grupo Control	-,920*	,034	,000	-,99	-,85
	Gluconato de clorhexidina al 2%	-,480*	,034	,000	-,55	-,41
	EDTA al 17%	-,760*	,034	,000	-,83	-,69
Gluconato de clorhexidina al 2%	Grupo Control	-,440*	,034	,000	-,51	-,37
	Hipoclorito de Sodio al 5%,	,480*	,034	,000	,41	,55
	EDTA al 17%	-,280*	,034	,000	-,35	-,21
EDTA al 17%	Grupo Control	-,160*	,034	,000	-,23	-,09
	Hipoclorito de Sodio al 5%,	,760*	,034	,000	,69	,83
	Gluconato de clorhexidina al 2%	,280*	,034	,000	,21	,35

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 8. Autorización para uso de laboratorio.

HORARIO DISPONIBLE PARA EL USO DE LABORATORIOS DE CIENCIAS MÉDICAS
PARA EL DESARROLLO DE TESIS

TESISTAS: CASTILLO ALBERCA ELIA YSELI
TEMOCHE IPANAQUÉ ALMA MISHELLE DEL CARMEN

ASESOR : BLGO. MIGUEL RUIZ BARRUETO

TÍTULO DE PROYECTO DE TESIS:

"Citotoxicidad in vitro de los irrigantes endodónticos hipoclorito de sodio 5%, gluconato de clorhexidina 2% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 17% sobre linfocitos humanos"

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA, PARASITOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO:

DÍA	HORA
Martes	16:30 - 19:10

LABORATORIO DE BIOLOGÍA:

DÍA	HORA
Jueves	18:00 - 21:00

Se extiende el presente documento para los fines correspondientes.

Piura, 16 de mayo de 2019




Bigo: RONALD VILCHEZ SÁNCHEZ
Jefe de Laboratorios de Ciencias Médicas
UCV - Piura

Anexo 9. Acta de aprobación de originalidad de tesis.

 UCV UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO	ACTA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS	Código : F06-PP-PR-02.02 Versión : 09 Fecha : 23-03-2018 Página : 1 de 1
--	--	---

Yo, **MIGUEL ANGEL RUIZ BARRUETO**, docente de la Facultad DE CIENCIAS MÉDICAS y Escuela Profesional de Estomatología de la Universidad César Vallejo Filial Piura, revisor de la tesis titulada:

“CITOTOXICIDAD IN VITRO DE LOS IRRIGANTES ENDODÓNTICOS HIPOCLORITO DE SODIO 5%, GLUCONATO DE CLORHEXIDINA 2% Y ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO (EDTA) 17% SOBRE LINFOCITOS HUMANOS”, de las estudiantes **Castillo Alberca, Elia Yseli y Temoche Ipanaqué, Alma Mishelle Del Carmen**, constato que la investigación tiene un índice de similitud de 17 % verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

Piura, 26 de julio del 2019.



Firma

M.Sc. Miguel Angel Ruiz Barreto

DNI: 42814146



Elaboró	Dirección de Investigación	Revisó	Responsable del SGC	Aprobó	Vicerrectorado de Investigación
---------	----------------------------	--------	---------------------	--------	---------------------------------

Anexo 10. Screenshot porcentaje de similitud del Turnitin.

UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

TÍTULO: "ACTIVIDAD IN VITRO DE LOS BRIGANTES UNIÓN IONES HIDROXIDO DE SODIO 5%, GLUCONATO DE CLORURO DE BINA 2% Y ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO (EDTA) 1% SOBRE LINFOCITOS HUMANOS"

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
Cirujano Dentista

AUTORES:
Castillo Albreca, Ella Yaeli (ORCID: 0000-0002-3971-6833)
Tamoche Ipanagá, Alma Michelle Del Carmen (ORCID: 0000-0002-0573-8800)

ASESOR:
M.Sc. Mdlgo. Miguel Ángel Ruiz Barrero (ORCID: 0000-0002-3373-4671)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

PIURA - PERÚ

Resumen de coincidencias

17 %

Rank	Source	Percentage
1	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	3 %
2	docplayer.es Fuente de Internet	3 %
3	Entregado a Universida... Trabajo del estudiante	2 %
4	repositorio.unheval.edu... Fuente de Internet	1 %
5	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	1 %
6	www.omniascience.com Fuente de Internet	1 %
7	Entregado a Universida... Trabajo del estudiante	1 %



Anexo 11. Autorización de publicación de tesis en repositorio institucional UCV.

 UCV UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO	AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS EN REPOSITORIO INSTITUCIONAL UCV	Código : F08-PP-PR-02.02
		Versión : 09
		Fecha : 23-03-2018
		Página : 1 de 1

Yo, **Temoche Ipanaqué Alma Mishelle Del Carmen**, identificada con DNI N° 41020229, egresada de la Escuela Profesional de **ESTOMATOLOGÍA** de la Universidad César Vallejo, autorizo (**X**), No autorizo () la divulgación y comunicación pública de mi trabajo de investigación titulado **"Citotoxicidad *in vitro* de los irrigantes endodónticos Hipoclorito de Sodio 5%, Gluconato de clorhexidina 2% y Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 17% sobre linfocitos humanos"**; en el Repositorio Institucional de la UCV (<http://repositorio.ucv.edu.pe/>), según lo estipulado en el Decreto Legislativo 822, Ley sobre Derecho de Autor, Art. 23 y Art. 33

Fundamentación en caso de no autorización:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



 FIRMA



DNI N° 41020229

FECHA: 26 de julio del 2019

Elaboró	Dirección de Investigación	Revisó	Responsable del SGC	Aprobó	Vicerrectorado de Investigación
---------	----------------------------	--------	---------------------	--------	---------------------------------

Yo, **Castillo Alberca Elia Yseli**, identificada con DNI N° 48351075, egresada de la Escuela Profesional de **ESTOMATOLOGÍA** de la Universidad César Vallejo, autorizo (**X**), No autorizo () la divulgación y comunicación pública de mi trabajo de investigación titulado "**Citotoxicidad *in vitro* de los irrigantes endodónticos Hipoclorito de Sodio 5%, Gluconato de clorhexidina 2% y Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) 17% sobre linfocitos humanos**"; en el Repositorio Institucional de la UCV (<http://repositorio.ucv.edu.pe/>), según lo estipulado en el Decreto Legislativo 822, Ley sobre Derecho de Autor, Art. 23 y Art. 33

Fundamentación en caso de no autorización:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....


 FIRMA



DNI N° 48351075

FECHA: 26 de julio del 2019

Elaboró	Dirección de Investigación	Revisó	Responsable del SGC	Aprobó	Vicerrectorado de Investigación
---------	----------------------------	--------	---------------------	--------	---------------------------------

Anexo 12. Autorización de la versión final del trabajo de investigación.



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

AUTORIZACIÓN DE LA VERSIÓN FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

CONSTE POR EL PRESENTE, EL VISTO BUENO QUE OTORGA EL ENCARGADO DE INVESTIGACIÓN DE
EP DE ESTOMATOLOGÍA

A LA VERSIÓN FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:
TEMOCHE IPANAQUÉ ALMA MISHELLE DEL CARMEN

INFORME TITULADO:

“CITOTOXICIDAD IN VITRO DE LOS IRRIGANTES ENDODÓNTICOS
HIPOCLORITO DE SODIO 5%, GLUCONATO DE CLORHEXIDINA 2% Y
ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO (EDTA) 17% SOBRE
LINFOCITOS HUMANOS”

PARA OBTENER EL TÍTULO O GRADO DE:

CIRUJANO DENTISTA

SUSTENTADO EN FECHA: 26/07/2019

NOTA O MENCIÓN: TRECE (13)

FIRMA DEL ENCARGADO DE INVESTIGACIÓN





UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

AUTORIZACIÓN DE LA VERSIÓN FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

CONSTE POR EL PRESENTE, EL VISTO BUENO QUE OTORGA EL ENCARGADO DE INVESTIGACIÓN DE
EP DE ESTOMATOLOGÍA

A LA VERSIÓN FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:

CASTILLO ALBERCA ELIA YSELI

INFORME TÍTULADO:

"CITOTOXICIDAD IN VITRO DE LOS IRRIGANTES ENDODÓNTICOS
HIPOCLORITO DE SODIO 5%, GLUCONATO DE CLORHEXIDINA 2% Y
ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO (EDTA) 17% SOBRE
LINFOCITOS HUMANOS"

PARA OBTENER EL TÍTULO O GRADO DE:

CIRUJANO DENTISTA

SUSTENTADO EN FECHA: 26/07/2019

NOTA O MENCIÓN: TRECE (13)

FIRMA DEL ENCARGADO DE INVESTIGACIÓN

