



# Propuesta de un modelo experimental *in vitro* para evaluar alteraciones morfológicas de eritrocitos expuestos a NaOCl 5.25%

## *Proposal for experimental in vitro model to assess morphological alterations in erythrocytes exposed to 5.25% NaOCl*

Roberto Arroyo Cervantes,\* Sergio Iván Cuin Macedo,§ Benigno Miguel Calderón Rojas,<sup>||</sup> Diana Ened Rodríguez Zaragoza,<sup>¶</sup> Héctor Ruiz Reyes\*\*

### RESUMEN

**Introducción:** El hipoclorito de sodio (NaOCl) es el agente químico más utilizado como solución irrigadora durante la terapia endodóntica. Es altamente tóxico cuando se extruye a tejido periapicales. En endodoncia la hemólisis causada por el NaOCl ha quedado demostrada utilizando diferentes modelos, sin embargo poca o ninguna evidencia se tiene de las alteraciones morfológicas en la membrana celular de los eritrocitos. **Objetivo:** Proponer un modelo experimental que permita evaluar las alteraciones morfológicas que sufren los eritrocitos cuando son expuestos a NaOCl utilizado en la práctica odontológica mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución (MEB). **Material y métodos:** Se obtuvieron 20 mL de sangre periférica y se depositaron en tubos con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminetetraacético). Se realizaron lavados con solución amortiguadora de fosfatos (solución Evan's). Se prepararon diferentes diluciones de la muestra de eritrocitos (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16). Se obtuvieron 100 µL de cada una de estas diluciones y se confrontaron con 100 µL de NaOCl 5.25% de uso odontológico (Viarzoni-T, Medental®). Se tomaron 0.5 µL de estas muestras para depositarse en un portamuestra de aleación Zn-Cu, el cual se sometió a un proceso de metalización de baño de iones de Cu por el método antiguo llamado *Sputtering*. Obteniendo microfotografías por MEB. **Resultados:** Se lograron observar eritrocitos con alteración de tipo anisocitosis y poikilocitosis (estomatocitos, eliptocitos, esferocitos y discocitos). También se observaron algunas características estructurales de cristales de NaOCl. **Conclusión:** Este modelo experimental permitió evaluar los cambios morfológicos que sufren los eritrocitos cuando son expuestos a NaOCl 5.25%.

**Palabras clave:** Modelo experimental, hipoclorito de sodio, eritrocitos.

**Key words:** Experimental model, sodium hypochlorite, erythrocytes.

### ABSTRACT

**Introduction:** Sodium hypochlorite (NaOCl) is the chemical agent most frequently used as irrigation solution during endodontic therapy. When extruded to periapical tissue, it is highly toxic. In endodontics, hemolysis caused by NaOCl has been proven using different models, nevertheless, there is little or no evidence of morphological alterations in the cellular membrane of erythrocytes. **Objective:** To propose an experimental model which might allow to assess morphological alterations suffered by erythrocytes when they are exposed to NaOCl used in the dental practice by means of high resolution scanning electron microscopy (SEM). **Materials and methods:** In the present study, 20 mL of peripheral blood were obtained and deposited in tubes with EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) anticoagulant. Rinses were conducted with a phosphate buffer solution (Evan's solution). Several dilutions of the erythrocyte sample were prepared (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16); 100 µL of each of these dilutions was obtained to be then confronted with 100 µL of dental use 5.25% NaOCl (Viarzoni-T, Medental®); 0.5 µL of these samples were taken to then be deposited in a sample holder made of Zn-Cu alloy which was subjected to a process of Cu ion metallization bath, following the old *Sputtering* method. Microphotographs were obtained with SEM. **Results:** Erythrocytes with alteration type anisocytosis and poikilocytosis (stomatocytes, elliptocytes and discocytes) were observed. Some structural characteristics of NaOCl crystals were equally observed. **Conclusion:** This experimental model allowed assessment of morphological changes experienced by erythrocytes when exposed to 5.25% NaOCl.

www.medigraphic.org.mx

\* Cirujano Dentista, Especialista en Endodoncia, Profesor de Asignatura «B».

§ Cirujano Médico Partero, Especialista en Hematología, Profesor de Asignatura «B».

<sup>||</sup> Cirujano Dentista, Especialista en Endodoncia, Profesor de Asignatura «B», interino.

¶ Cirujano Dentista, Especialista en Endodoncia, egresada del Postgrado de Endodoncia. CUEPI.

\*\* Maestro en Farmacología Básica, Profesor de Asignatura «B».

Facultad de Odontología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (UMSNH).

Recibido: agosto 2015.

Aceptado: marzo 2016.

© 2016 Universidad Nacional Autónoma de México, [Facultad de Odontología]. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam>

## INTRODUCCIÓN

El hipoclorito de sodio (NaOCl) es el agente químico más utilizado como solución irrigadora durante la terapia endodóntica,<sup>1,2</sup> debido a su actividad antimicrobiana de amplio espectro,<sup>3</sup> capacidad de disolver tejido vital y necrótico,<sup>4,5</sup> además de presentar una baja viscosidad facilitando su penetración en el sistema de conductos radiculares.<sup>6</sup> Se emplea a diferentes concentraciones que van desde 0.5% hasta 6.0%<sup>7</sup> siendo las concentraciones de 2.5% y 5.25% las más recomendadas por la literatura para su uso como irrigante.<sup>8-10</sup> Su mecanismo de acción antimicrobiano se explica por reacciones de neutralización de aminoácidos y cloraminación, mientras que la disolución de materia orgánica se debe a procesos de saponificación producto de la degradación de lípidos y ácidos grasos.<sup>11</sup>

Contrario a sus ventajas, el NaOCl por sí solo no presenta la capacidad de remoción de *smear layer* de las paredes del conducto, además desmineraliza la dentina e induce la corrosión de instrumentos endodónticos.<sup>12-14</sup> Sin embargo, la citotoxicidad del NaOCl es la propiedad que demanda al clínico tener mayor precaución durante su uso. La extrusión de este irrigante hacia el tejido periapical causa hemólisis, ulceración, inhibición en la migración de neutrófilos, así como daño en células endoteliales y fibroblastos.<sup>15-17</sup> Lo que clínicamente se manifiesta con dolor, ardor, edema y hematoma.<sup>18</sup>

La biocompatibilidad de los materiales en endodoncia es determinada por varios parámetros como genotoxicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad, histocompatibilidad, efectos antimicrobianos y citotoxicidad. Los estudios en cultivos celulares han sido empleados por más de 30 años en la evaluación de las reacciones de citotoxicidad inducidas por los materiales endodónticos.<sup>19</sup>

Entre los métodos utilizados para determinar la citotoxicidad se incluye la determinación de las alteraciones de la morfología celular por microscopía de luz, microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido (MEB).<sup>19</sup> Evaluaciones realizadas con MEB se han limitado a demostrar alteraciones prin-

cipalmente sobre líneas celulares de fibroblastos y periodontales.<sup>20-23</sup>

En otras áreas médicas la microscopía electrónica de barrido ha permitido evaluar anomalías de la membrana celular de hematíes.<sup>24</sup> Si bien en endodoncia la hemólisis causada por el NaOCl ha quedado demostrada utilizando diferentes modelos,<sup>25</sup> poca o ninguna evidencia se tiene de las alteraciones morfológicas en la membrana celular de los eritrocitos al contacto con soluciones de NaOCl de uso odontológico. Por lo tanto, el propósito del presente estudio es proponer un modelo experimental que permita evaluar las alteraciones morfológicas que sufren los eritrocitos cuando son expuestos a NaOCl utilizado en la práctica odontológica mediante MEB.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de muestra biológica

Se seleccionó un individuo masculino de 31 años de edad sin registro de datos patológicos de importancia, del cual se obtuvieron 20 mL de sangre periférica y se depositaron en tubos de vidrio estéril con anticoagulante EDTA. Se centrifugaron a 2,000 rpm/5 minutos, retirando el plasma por medio de micropipetas de 100-1,000  $\mu$ L (Spinreact®). Para el paquete celular se realizaron tres



Figura 1. Diluciones de hematíes con PBS.

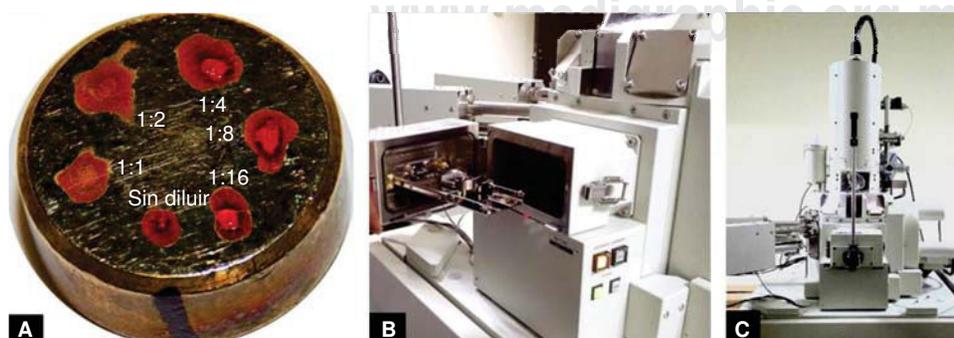


Figura 2.

**A)** Muestra biológica en portamuestra de Zn-Cu con diámetro y altura de 1 cm. **B)** Cámara de vacío del Microscopio Electrónico de Barrido de Campo de Alta Resolución. **C)** Microscopio Electrónico de Barrido de Campo de Alta resolución JEOL JSM-7600F.

lavados con solución de Evan's (solución amortiguadora de fosfatos PBS, Allerstand® registro 0027 R98 SSA, Lote: 407-360, México, D.F.) en proporción 2:1. Realizando una suspensión final de hematíes 2:1 con PBS.

### Preparación de diluciones de hematíes

Con la suspensión de hematíes se realizaron diferentes diluciones con PBS: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16, en microtubos de propileno (Eppendorf®) con capacidad de 1.5 mL (Figuras 1 y 2). Entonces, se obtuvieron 100  $\mu$ L de cada una de estas diluciones y se confrontaron con 100  $\mu$ L de NaOCl 5.25% de uso odontológico (Viarzoni-T, Medental®). De cada una de las confrontaciones con NaOCl 5.25% se tomaron 0.5  $\mu$ L y se depositaron en un portamuestra de aleación Zn-Cu con diámetro y altura de 1 cm. Las muestras fueron atemperadas durante un periodo de 30 días.

Posteriormente, se sometieron a un proceso de metalización de baño de iones de Cu por el método antiguo llamado **Sputtering** durante 15 minutos, el cual consistió en el bombardeo de la superficie de la muestra de hematíes con iones de Cu para formar láminas delgadas, esto con la finalidad de permitir el flujo de electrones emanados del haz del filamento favoreciendo el análisis morfológico de los hematíes. Para ello se empleó el equipo *Vacuum Coating*, modelo s150, marca: *Sputter Coating*. Este proceso de metalización por iones de Cu es parte fundamental en el desarrollo del modelo experimental celular que se propone, para valorar la morfología de los hematíes expuestos a NaOCl 5.25% de uso odontológico.

Para analizar la morfología de hematíes se obtuvieron imágenes a magnitudes de 100x, 250x, 500x, 1,000x y 5,000x en el modo de electrones secundarios retrodispersados empleando un microscopio electrónico de barrido de campo de alta resolución *JEOL JSM-7600F*. Además, se realizaron diferentes espec-

trogramas de la superficie en diferentes áreas de los hematíes, obteniendo espectros de energía dispersiva (EDS) a través del Microanalizador Bruker Xflash 6130 (Figura 3). Así mismo, se obtuvo el porcentaje en peso de los elementos que conforman la muestra de hematíes, estos análisis fueron determinados únicamente en imágenes a 1,000x.

Las imágenes obtenidas de cada una de las muestras fueron analizadas por médicos especialistas expertos en el Área de Hematología.

## RESULTADOS

Dentro de las anomalías que sufrieron los eritrocitos al exponerse con NaOCl 5.25% de uso odontológico se lograron observar glóbulos rojos con distintos tamaños que indican anisocitosis, así mismo, se detectaron formas anormales características de una poiquilocitosis (Figura 4). Entre las principales variaciones de la poiquilocitosis se identificaron estomatocitos, eliptocitos, esferocitos y discocitos (Figura 5). Además este modelo experimental permitió identificar algunas características estructurales de cristales de NaOCl (Figura 6).



Figura 3. Microanalizador Bruker Xflash 6130.

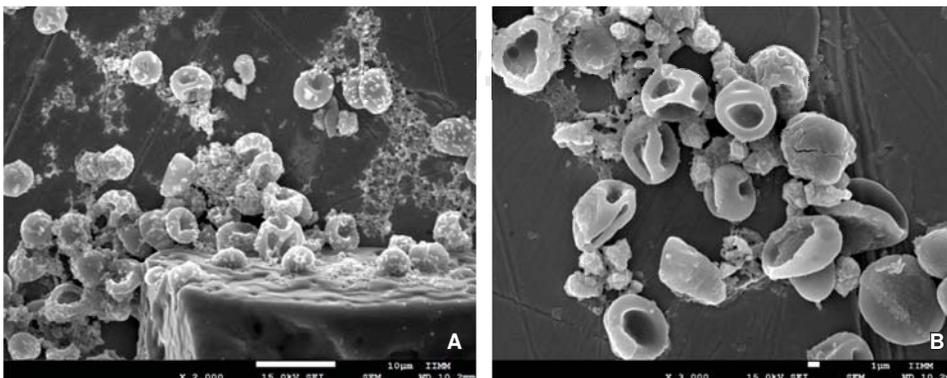
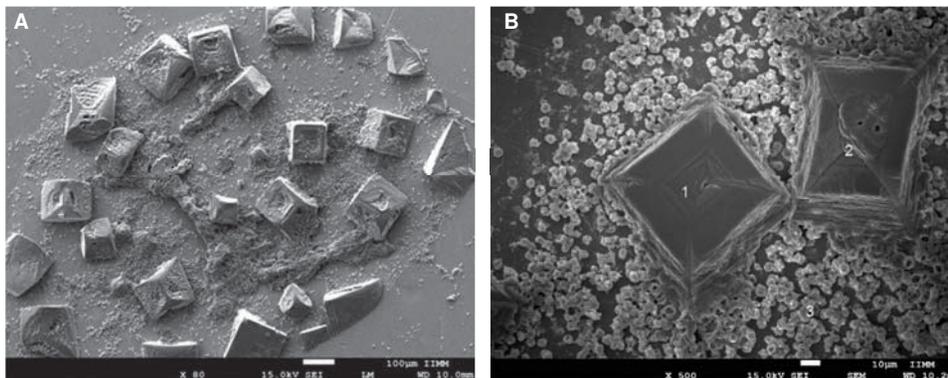


Figura 4.

**A)** Alteraciones morfológicas de eritrocitos inducidas por la exposición a NaOCl 5.25% de uso odontológico, en donde predominan formas características de poiquilocitosis. **B)** Formas características de anisocitosis.



**Figura 5.** Alteraciones morfológicas de eritrocitos expuestos a NaOCl 5.25% de uso odontológico, mediante imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido de alta resolución. **A)** Discocito: disco bicóncavo sin núcleo. **B)** Eliptocito: forma elíptica con extremidades redondeadas y paredes laterales poco abombadas. **C)** Esferocito: eritrocito esférico con denso contenido de hemoglobina sin claro o halo central. **D)** Estomatocito: eritrocito con una zona central elongada en forma de boca. **E)** Discocito a 10,000x en donde se observa daño estructural a nivel de la membrana plasmática.



**Figura 6.**

**A)** Presencia de cristales de NaOCl con diferentes estructuras geométricas distribuidos en la muestra. **B)** Cristales de NaOCl en contacto con eritrocitos a magnitud de 500x.

## DISCUSIÓN

Se ha observado que los modelos de experimentación *in vitro* han aportado información valiosa, permitiendo mejorar la comprensión de diversos fenómenos biológicos. El presente modelo experimental que emplea la microscopia electrónica de barrido de alta resolución permitió evaluar las alteraciones morfológicas de la membrana de eritrocitos expuestos a NaOCl 5.25% de uso odontológico, identificando con mayor frecuencia anomalías características de anisocitosis y poiquilocitosis (estomatocitos, eliptocitos, esferocitos y discocitos). De acuerdo con Wang, et al.,<sup>26</sup> el eritrocito es un modelo *in vitro* relativamente simple para evaluar la citotoxicidad de sustancias químicas. Los estudios realizados en eritrocitos, durante las últimas décadas, han permitido el desarrollo de conocimiento a detalle acerca de las alteraciones en la función de glóbulos rojos, así como también los desórdenes en su membrana, ya sea por factores externos, hereditarios o patológicos.<sup>27</sup> Por esta razón, es importante evaluar las alteraciones morfológicas de los eritrocitos cuando se exponen a soluciones de NaOCl de uso odontológico.

Ionescu-Zanetti et al.<sup>28</sup> y Bierbaum et al.,<sup>29</sup> mencionan el proceso de lisis que sufren los eritrocitos, a través del proceso de saponificación, en donde se ha observado que los lisofosfolípidos han demostrado porar la membrana hasta inducir su muerte cuando se adiciona con medios extracelulares. Esta poración permite que iones pequeños permeen la membrana y contenga proteínas aniónicas más grandes en el citoplasma. Los iones pequeños asociados con moléculas de agua, penetran la célula creando una presión osmótica positiva, lo que provoca una lisis osmótica coloidal; esto conlleva a la transición de discocitos y posteriormente de esferocitos antes de la muerte celular, estas formas también fueron reportadas en el presente estudio. Por otra parte, se encontraron formas características de eliptocitos y estomatocitos. Estas anomalías del eritrocito podrían depender de la viscosidad del fluido citoplasmático y de la rigidez de su membrana celular, las cuales se ven afectadas por los cambios en el potencial Redox y/o disminución de la oxidación en algunas de sus proteínas citoesqueléticas: espectrina y anquirina.<sup>30</sup> Estas proteínas se consideran de gran importancia para mantener la arquitectura de su membrana.<sup>31</sup>

El presente modelo experimental que utiliza microscopía electrónica de barrido de alta resolución permitió identificar las alteraciones que sufre la membrana plasmática de los eritrocitos, este modelo podría ser implementado para valorar la biocompatibilidad entre diversas soluciones irrigadoras convencionales utilizadas para el tratamiento de conductos radiculares.

### CONCLUSIÓN

El presente modelo experimental permitió evaluar los cambios morfológicos que sufren los eritrocitos cuando son expuestos a NaOCl 5.25%. Por lo que se considera que dicho modelo podría utilizarse para analizar la biocompatibilidad de futuras soluciones químicas que se puedan emplear tanto en el campo de la endodoncia como en otras áreas de estomatología, ya que se considera un modelo viable y de fácil reproducción.

### REFERENCIAS

- Gül S, Savsar A, Tayfa Z. Cytotoxic and genotoxic effects of sodium hypochlorite. *Cytotechnology*. 2009; 59 (2): 113-119.
- Kovac J, Kovac D. Effect of irrigating solutions in endodontic therapy. *Bratisl Lek Listy*. 2011; 112 (7): 410-415.
- Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababeh N, Qualtrough A, Worthington H et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2004; 37: 438-446.
- Clarkson RM, Moule AJ, Podlich H, Kellaway R, Macfarlane R, Lewis D. Dissolution of porcine incisor pulps in sodium hypochlorite solutions of varying compositions and concentrations. *Aust Dent J*. 2006; 51 (3): 245-251.
- Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod*. 2010; 36 (9): 1558-1562.
- Spencer HR, Ike V, Brennan PA. Review: the use of sodium hypochlorite in endodontics-potential complications and their management. *Br Dent J*. 2007; 202 (9): 555-559.
- Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010; 36 (3): 520-523.
- Marion JJC, Manhães FC, Bajo H, Duque TM. Efficiency of different concentrations of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Literature review. *Dental Press Endod*. 2012; 2 (4): 32-37.
- Cardenas BA et al. Hipoclorito de sodio en irrigación de conductos radiculares: sondeo de opinión y concentración en productos comerciales. *Rev Odontol Mex*. 2012; 16 (4): 252-258.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000; 26 (6): 331-334.
- Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mecanismo de ação do hipoclorito de sódio. *Braz Dent J*. 2002; 13 (2): 113-117.
- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, De Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97: 79-84.
- Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *J Endod*. 2004; 30 (12): 880-882.
- Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Chiesa M, Sforza D, Visai L. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite-based irrigating solutions. *Int J Artif Organs*. 2010; 33 (9): 654-659.
- Kerbl F, DeVilliers P, Litaker M, Eleazer PD. Physical effects of sodium hypochlorite on bone: an *ex vivo* study. *J Endod*. 2012; 38 (3): 357-359.
- De Sermeño RF, da Silva LA, Herrera H, Herrera H, Silva RA, Leonardo MR. Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108 (1): e46-49.
- 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: 843-848.
- Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium Hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J*. 2004; 37: 272-280.
- Hauman CH, 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.
- Navarro-Escobar E, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral, Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15 (1): e90-94.
- Hidalgo E, Bartolome R, Dominguez C. Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chem-Biol Interact*. 2002; 139: 265-282.
- Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. *In vitro* evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod*. 2005; 31 (10): 746-748.
- Bajrami D, Hoxha V, Görduysus Ö, Muftuoglu S, Zeybek N, Küçükkaya S. Cytotoxic effect of endodontic irrigants *in vitro*. *Med Sci Mon Basic Res*. 2014; 20: 22-26.
- Ciccoli L, De Felice C, Paccagnini E, Leoncini S, Pecorelli A, Signorini C. Morphological changes and oxidative damage in Rett syndrome erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820 (4): 511-520.
- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod*. 1985; 11 (12): 525-528.
- Wang C, Qin X, Huang B, He F, Zeng C. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 402 (4): 773-777.
- An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol*. 2008; 141 (3): 367-375.
- Ionescu-Zanetti C, Wang LP, Di Carlo D, Hung P, Di Blas A, Hughey R et al. Alkaline hemolysis fragility is dependent on cell shape: results from a morphology tracker. *Cytometry A*. 2005; 65 (2): 116-123.
- Bierbaum TJ, Bouma SR, Huestis WH. A mechanism of erythrocyte lysis by lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta*. 1979; 555 (1): 102-110.
- Muravyon AV, Tikhomirova IA. Role molecular signaling pathways in changes of red blood cell deformability. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013; 53 (1-2): 45-49.
- Ciccoli L, De Felice C, Paccagnini E, Leoncini S, Pecorelli A, Signorini C et al. Erythrocyte shape abnormalities, membrane oxidative damage, and b-actin alterations: an unrecognized triad in classical autism. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 432616.

Dirección para correspondencia:  
**C.D.E.E. Roberto Arroyo Cervantes**  
 E-mail: acroberto\_83@hotmail.com