



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN CUEPI

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

TESIS

“EFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA
SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS
RADICULARES IN VITRO”

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

PRESENTA:

C.D. BALVIR MARTÍN MARÍN CORREA

ASESORA DE TESIS: M. EN E. NAYELLI GUZMÁN MARTÍNEZ

COASESORA DE TESIS: D. T. A. GRISEL FIERROS ROMERO



MORELIA, MICHOACÁN

MÉXICO JUNIO 2018

Dedicatoria

A mis padres, por formar de mi un hombre libre y de buenas costumbres. De ante mano sé que no existe una forma de agradecer toda una vida de sacrificios y esfuerzos, por ser los principales promotores de mis sueños, por creer en mí y mis expectativas, quiero que sientan que esta meta lograda también es suya y que la motivación que me ayudo a llegar hasta aquí fue su amor.

A mi tío Jorge y a mi tía Yanin, por darme un ejemplo digno de superación y entrega porque gran parte de esto es gracias a ti tío, por confiar en mí y brindarme su apoyo.

Agradecimientos

A mi directora de tesis M. E. Nayelli, por su exigencia académica ya que creo es el camino para alcanzar la calidad y demandar lo mejor de cada alumno. Por guiarme durante todo el trayecto de la especialidad, por haberme permitido el desarrollo de esta tesis, su experiencia y su ayuda y sus consejos fueron determinantes.

A D.T.A. Grisel quien además de transmitirme su vocación investigadora, me oriento, ayudo constantemente y directamente en todos los aspectos de la tesis. Agradecerte la confianza que me demostraste, así como la dedicación y tu amistad que en todo momento me han ofrecido.

Al C.D.E.E. Benigno por su integridad como catedrático y como persona, así como su compromiso con todos sus alumnos, por el tiempo dedicado a aclarar mis dudas en cada clase y fuera de ellas, por ser un gran profesional el cual este posgrado (CUEPI) se debe enorgullecer de tenerlo como docente.

Al M.O. Alberto Loeza, por sus consejos, por su enseñanza por llamarme la atención cuando fue necesario, por retarme a ser mejor profesional cada día.

A las Dras. Norma y Marlenne por haberme recibido en su grupo de investigación en CICATA, por sus consejos y gran sabiduría paciencia y animo que me brindaron durante mi estancia donde tuve la oportunidad de aprender y acabar parte de este trabajo.

A la Dra. Nina Bogdanchikova, por la donación, por las instrucciones y consejos para el mejor manejo de las nanopartículas de plata (Argovit™) que fueron la base principal para el desarrollo de esta tesis.

A mi padrino Roberto por acompañarme desde el principio. Por darme ese abrazo cuando lo necesitaba y aconsejarme siempre, por darme todo su amor y calidez.

A mis compañeros Teté, Dalila, Mayra, Cintia García, Cynthia Muzquiz, Juan, Jacky, Jonas, Barush, Yunuen y Selene. El trato diario nos hizo ser hermanos, cada uno de nosotros tomamos distintos caminos, pero quiero recordarles que seguramente nos volveremos a ver, quiero decirles que los llevo en mi corazón, les deseo todo el éxito del mundo, luchan por sus ideales, fórgense más metas, la vida es de retos y la constante superación les traerá más oportunidades de éxito, sépanse queridos y cuando necesiten algo sepan que en mi tienen no un amigo, sino un hermano que estará apoyándolos siempre.

A mi hermano Diego por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A todos mis amigos porque con sus consejos y palabras de aliento forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

A todos mis maestros del Centro Universitario de Estudios de Posgrado e Investigación (CUEPI) que me enseñaron a amar esta profesión y por brindar su conocimiento sin condiciones: Adriana Arenas, Paola Pérez, Manuel Ortiz, Laysa García, Jaqueline Fraga, Fernando Fernández.

Índice

| CONTENIDO | PÁGINA |
|--|---------------|
| Dedicatoria | 2 |
| Agradecimientos | 3 |
| Resumen | 12 |
| Abstract | 13 |
| 1.INTRODUCCIÓN | 14 |
| 2. ANTECEDENTES GENERALES | 17 |
| 2.1. Pronóstico del tratamiento endodóntico | 17 |
| 2.2 Microbiología del conducto radicular | 20 |
| 2.3. <i>Enterococcus faecalis</i> | 23 |
| 2.4. Biofilm | 25 |
| 2.5. Quorum sensing | 27 |
| 2.6. Preparación biomecánica | 28 |
| 2.7. Medicación intraconducto | 29 |
| 2.8. Hidróxido de calcio Ca(OH) ₂ | 31 |
| 2.9. Nanotecnología | 32 |
| 2.9.1. Nanopartículas de plata | 34 |
| 3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS | 37 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 40 |
| 5.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 40 |
| 6.JUSTIFICACIÓN | 41 |
| 7. OBJETIVOS | 41 |

| | |
|--|----|
| 7.1 Objetivo general | 41 |
| 7.2 Objetivos específicos | 41 |
| 8. HIPÓTESIS | 42 |
| 9. CONSIDERACIONES ÉTICAS | 42 |
| 10.METODOLOGÍA | 43 |
| 10.1 Cultivo bacteriano y medio de cultivo | 43 |
| 10.2 Nanopartículas de plata | 43 |
| 10.3 Preparación de los especímenes dentales | 43 |
| 10.4 Cinética de crecimiento de <i>E. faecalis</i> | 44 |
| 10.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de las nanopartículas de plata en medio líquido | 45 |
| 10.6 Infección de los especímenes dentales | 45 |
| 10.7 Elaboración de gel de nanopartículas de plata | 46 |
| 10.8 Metodología de prueba estadística | 48 |
| 11.RESULTADOS | 49 |
| 11.1 Crecimiento y morfología de <i>E. faecalis</i> | 49 |
| 11.2 Cinética de crecimiento de <i>E. faecalis</i> | 49 |
| 11.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de las Ag-NP en medio líquido. | 50 |
| 11.4 Infección de los especímenes dentales | 53 |
| 11.5 Análisis SEM/EDS de los especímenes | 54 |
| 11.6 Gel con nanopartículas de plata | 59 |

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

| | | |
|------------|---|----|
| 11.7 | Conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) de <i>E. faecalis</i> por grupo y por muestra | 59 |
| 11.8 | Medición de la actividad antimicrobiana de la medicación | 60 |
| 12. | DISCUSIÓN | 63 |
| 13. | CONCLUSIÓN | 68 |
| 14. | PERSPECTIVAS | 69 |
| 15. | REFERENCIAS | 70 |
| 16. | ANEXOS | 82 |

Índice de tablas

| CONTENIIDO | PÁGINA |
|---|---------------|
| Tabla1: Limitaciones de las estrategias actuales de tratamiento antimicrobiano tópico o sistémico para el manejo de enfermedades infecciosas. | 15 |
| Tabla 2: Estudios de investigación de la prevalencia de <i>E. faecalis</i> en dientes que presentan periodontitis apical | 24 |
| Tabla 3. Grupos de estudio | 47 |
| Tabla 4: Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). | 53 |
| Tabla 5: Porcentaje de reducción microbiano. | 61 |
| Tabla 6: Comparación de diferentes estudios con gel de Ag-NP contra <i>E. Faecalis</i> | 65 |

Índice de figuras

| CONTENIDO | PÁGINA |
|---|--------|
| Figura 1: Representación gráfica de las tasas de éxito en porcentaje de estudios de seguimiento posteriores al tratamiento inicial con endodoncia, desde 1956 hasta 2004. | 18 |
| Figura 2: Fases de la patogénesis del quiste periapical: A) Inicio, B) Formación del quiste, C) Crecimiento. | 22 |
| Figura 3: Desarrollo de una biopelícula de múltiples especies a lo largo del tiempo. (1) Acondicionamiento de la superficie, (2) Adhesión inicial de las células bacterianas, (3) Crecimiento y maduración del biofilm (4) Separación. | 26 |
| Figura 4: Mecanismo de acción antimicrobiano de las Ag-NP | 36 |
| Figura 5: Parte de la población de órganos dentales procesados para este estudio. | 44 |
| Figura 6: <i>Enterococcus faecalis</i> . Tinción de Gram se observa que son cocos Gram positivos. Vistos en un microscopio objetivo 1000x. | 49 |
| Figura 7: Densidad óptica de un cultivo de <i>E. faecalis</i> en caldo BHI (Fluka, Sigma) crecido a 37°C durante 24 horas. | 50 |
| Figura 8: Promedio de absorbancias evaluado por densidad óptica y desviación estándar del efecto de diferentes concentraciones de Ag-NP sobre el crecimiento de <i>Enterococcus faecalis</i> a 37°C por 24 horas. evaluado por densidad óptica según la concentración, con el control positivo. | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 9: Porcentaje de crecimiento del efecto de la concentración de nanopartículas de plata sobre el crecimiento de <i>Enterococcus faecalis</i> a 37°C 24 horas. para CMI. | 52 |
| Figura 10: Órganos dentales sumergidos en 1 ml de caldo con cultivo de <i>Enterococcus faecalis</i> . | 54 |
| Figura 11: Imágenes SEM (2200x) antes y después de la formación de biofilm. | 55 |
| Figura 12: Micrografía en la cual se analiza la bacteria <i>E. faecalis</i> observando morfología cocácea sobre el tejido dentinario (10000x). | 55 |
| Figura 13: Mapeo EDS indicando con puntos blancos la distribución de las Ag-NP a 500 ppm sobre dentina radicular (2000x). | 56 |
| Figura 14: Espectro EDS que muestra la composición de los elementos presentes en la dentina y de plata de las Ag-NP, en espécimen medicado a 500 ppm. | 57 |
| Figura 15: SEM indicando la distribución del Ca(OH) ² sobre la dentina radicular (2000x) | 58 |
| Figura 16: Espectro EDS que muestra la composición de los elementos presentes en la dentina y de Ca(OH) ² , en espécimen medicado con Ultracal XS®. | 58 |
| Figura 17: Preparación de gel de Ag-NP y envasado en jeringa. | 59 |

Figura 18: Conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) en caja Petri: A) Grupo Control, B) Grupo Ca(OH)², C) Grupo Ag-NP 300 ppm, D) Grupo Ag-NP 500 ppm. 60

Figura 19: Recuento de UFC de *E. Faecalis* intraconducto de los diferentes grupos de medicación y del grupo control a diferentes tiempos. 61

Figura 20: Reducción en porcentaje de *E. Faecalis* intraconducto de los diferentes grupos de medicación a diferentes tiempos. 62

Figura 21: Actividad antimicrobiana de cono de gutapercha comercial y cono de gutapercha impregnado de Ag-NP sobre cepa de *Enterococcus faecalis* en medio sólido. 68

Resumen

Introducción: La nanotecnología se ha convertido en un área de investigación con resultados prometedores para la innovación tecnológica; en consecuencia, la endodoncia puede beneficiarse de este campo de la investigación, debido a las diferentes propiedades químicas y físicas de los materiales producidos en una escala nanométrica. La actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata (Ag-NP) contra varias especies de microorganismos de interés endodóntico ha sido registrada en varias investigaciones. **Objetivo:** Evaluar la eficacia antibacteriana de un modelo en gel de nanopartículas de plata (Ag-NP) como medicamento contra *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) crecidas en las paredes del conducto radicular. **Metodología:** Se determinó la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de Ag-NP frente a *E. faecalis*, a partir del método de macrodilución. Un total de 60 dientes humanos extraídos de una sola raíz se contaminaron con *E. faecalis* se trataron con hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) Ultracal XS® (control positivo), gel de Ag-NP a una concentración de 300 ppm, gel de Ag-Np 500ppm y agua estéril (como control negativo). Las muestras se obtuvieron por succión con micropipeta y limas tipo K a las 24 y 168 horas posteriores de la medicación del conducto radicular y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC). **Resultados:** Las Ag-NP presentaron acción antimicrobiana frente a *E. faecalis in vitro*, con valores de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de 300 ppm y 900 ppm, respectivamente. Al ser utilizadas como medicación intraconducto en un modelo *in vitro*, su efecto antimicrobiano a 300 ppm y 500 ppm fue equivalente a la acción de Ultracal XS®. **Conclusión:** Este estudio resaltó la ventaja potencial de una alternativa de medicación intraconducto en el área endodóntica.

Palabras Claves: Nanopartículas de plata, *E. faecalis*, biofilm, hidróxido de calcio, endodoncia.

Abstract

Introduction: Nanotechnology has become a research area with promising results for technological innovation; consequently, endodontics can benefit from this field of research, due to the different chemical and physical properties of the materials produced in a nanometric scale. The antibacterial activity of silver nanoparticles (Ag-Np) against several species of microorganisms of endodontic interest has been recorded in several investigations. **Aim:** To evaluate the antibacterial efficacy of a silver nanoparticles (Ag-NP) gel model as a drug against *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) grown on the walls of the root canal. **Methodology:** The minimum inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration of Ag-NP against *E. faecalis* was determined from the dilution method. A total of 60 human teeth extracted from a single root were contaminated with *E. faecalis* and treated with calcium hydroxide (Ca(OH)₂) Ultracal XS® (positive control), Ag-NP gel at a concentration of 300 ppm, Ag-Np 500ppm gel and sterile water (as negative control). The samples were obtained by suction with micropipette and files type K at 24 and 168 hours after root canal medication and the number of colony forming units (CFU) was determined. **Results:** Ag-NP presented antimicrobial action against *E. faecalis* in vitro, with values of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of 300 ppm and 900 ppm, respectively. When used as root canal medication in an *in vitro* model, its antimicrobial effect at 300 ppm and 500 ppm was equivalent to the action of Ultracal XS®. **Conclusion:** This study highlighted the potential advantage of an alternative root canal medication in the endodontic area.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente investigaciones a nivel mundial indican que la tasa de éxito del tratamiento endodóntico oscila de 86-98% ⁽¹⁾. Sin embargo, existe una diversidad de factores que pueden influir en el resultado final, por tal razón, no ha habido un consenso en la literatura sobre una definición consistente de criterios de "éxito" de tratamiento endodóntico. Del mismo modo, "fracaso" tiene definiciones variables.

En la investigación de Kakehashi *et al.* ⁽²⁾ emplearon ratas libres de bacterias y ratas convencionales (con bacterias) en las cuales expusieron cavidad pulpar en algunos dientes. En este estudio, las ratas comían teniendo la pulpa expuesta, después de un periodo prolongado, en las ratas libres de gérmenes no se produjo necrosis, incluso hubo formación de puentes dentinarios en algunos casos. Por el contrario, todas las ratas convencionales desarrollaron necrosis pulpar y periodontitis apical. Este estudio concluyó que las bacterias y sus subproductos son un factor importante en la iniciación, propagación y persistencia de la enfermedad pulpar y periapical.

Es importante la eliminación de microorganismos alojados dentro del sistema de conductos radiculares infectados para un pronóstico del tratamiento de conductos favorable. La mayoría de los microorganismos y la pulpa necrótica se eliminan por procedimientos de rutina tales como la limpieza químico-mecánica del espacio pulpar ^(3,4).

Se denomina medicamento intraconducto a cualquier agente químico sellador dentro del sistema de conductos radiculares utilizado entre citas como calmante y agente antibacteriano ⁽⁵⁾. El hidróxido de calcio se considera el medicamento intraconducto más utilizado ya que se piensa que el efecto bactericida de este se debe a que genera un pH de 9.5-12, en el que la mayoría de los microorganismos pueden ser eliminados ya que pocos pueden resistir a un nivel pH de 11 ^(6,7).

A pesar de la gran diversidad de medicamentos intraconducto que se han empleado para mejorar la eliminación bacteriana aún existen limitaciones que han impedido que este objetivo se alcance eficazmente como se muestra en la tabla 1 ⁽⁸⁾.

Tabla1: Limitaciones de las estrategias actuales de tratamiento antimicrobiano tópico o sistémico para el manejo de enfermedades infecciosas.

| | | |
|-----------------------------------|---|--|
| 1. Factores microbianos | a. Cepas mutantes resistentes a antibióticos. | <ul style="list-style-type: none"> • MRSA • <i>Enterococcus</i> resistentes a la vancomicina |
| | b. Mecanismos de resistencia antibiótica. | <ul style="list-style-type: none"> • Intercambio de material genético. • Deficiencia de conductos de porina específicos. • Promoción del flujo activo de medicamentos. • Engrosamiento de la capa de peptidoglicano de la pared externa. |
| | c. Estructura y organización de microbios | <ul style="list-style-type: none"> • Variación en la pared externa en diferentes clases de bacterias y hongos • Formación de biofilms. • La existencia de protozoos en etapa de alimentación trófica de la etapa quística en reposo |
| 2. Mal uso de antibióticos | | <ul style="list-style-type: none"> • Prescripción excesiva o inapropiada. • No completar la prescripción del tratamiento. • Uso generalizado de antibióticos en alimentos para el ganado |

Tomado de: Kishen A, Shrestha A. (2015).

Las Ag-NP han tenido diversas aplicaciones debido a sus efectos antibacterianos y antiinflamatorios. Las Ag-NP que tienen un intervalo de tamaños de 10-100 nm presentan un fuerte potencial bactericida contra Gram-positivos y Gram-negativas (9,10,11). Se ha demostrado que las Ag-NP fueron eficaces en la eliminación de *E. faecalis* el principal microorganismo asociado a tratamientos de endodoncia fallidos (12).

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto antibacteriano de un modelo de medicamento en gel con nanopartículas de plata como medicamento contra *Enterococcus faecalis* presentes en las paredes del conducto radicular.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Pronóstico del tratamiento endodóntico

Friedman *et. al.* ⁽¹³⁾ presentaron una gráfica cronológica de varios reportes de autores donde señalan las tasas de éxito en el tratamiento de endodoncia, en la figura 1 se presentan los diferentes estudios.

Sin embargo, para evaluar el resultado de cualquier enfermedad, se debe hacer mención del término “pronóstico” que lo podemos definir como la predicción de evolución probable de recuperación para cualquier enfermedad considerando la evaluación del caso, y es una consecuencia de las decisiones a tomar por el clínico para un tratamiento ⁽¹⁴⁾. Investigadores y asociaciones de especialistas en endodoncia han tratado de unificar criterios en relación a la determinación del resultado del tratamiento de conductos, sin embargo, en la actualidad no hay un consenso en la literatura sobre los aspectos a considerar para establecer que un tratamiento endodóntico presento éxito. La pluralidad de criterios es la razón por la cual no es posible analizar objetivamente todos los estudios de resultados de tratamientos de conductos, tampoco compararlos debido a la diversidad de factores en cada etapa del tratamiento que alteran el pronóstico ^(15, 16). Tales factores pueden clasificarse en preoperatorios, transoperatorios y postoperatorios ⁽¹⁷⁾.

- Preoperatorios: Un correcto diagnóstico de la etapa de la infección pulpar, es básico para una interpretación de los principales factores biológicos reflejados en un tratamiento, alterando el proceso de la enfermedad y evolución de la infección ⁽¹⁸⁾. Los diagnósticos con lesiones periapicales preoperatorias suelen tener periodos más amplios con la infección en comparación con los dientes sin una lesión periapical ya que las infecciones pulpares también pueden establecer lesiones periapicales secundaria (puede ser independiente a la infección pulpar), lo que resulta en una infección extraradicular. En consecuencia, sería más difícil eliminar bacterias en el sistema de conductos radiculares en los dientes afectando el resultado del tratamiento ^(19, 20). Así como un peor pronóstico en pacientes con enfermedades sistémicas como la diabetes ^(15, 21).

**EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO***

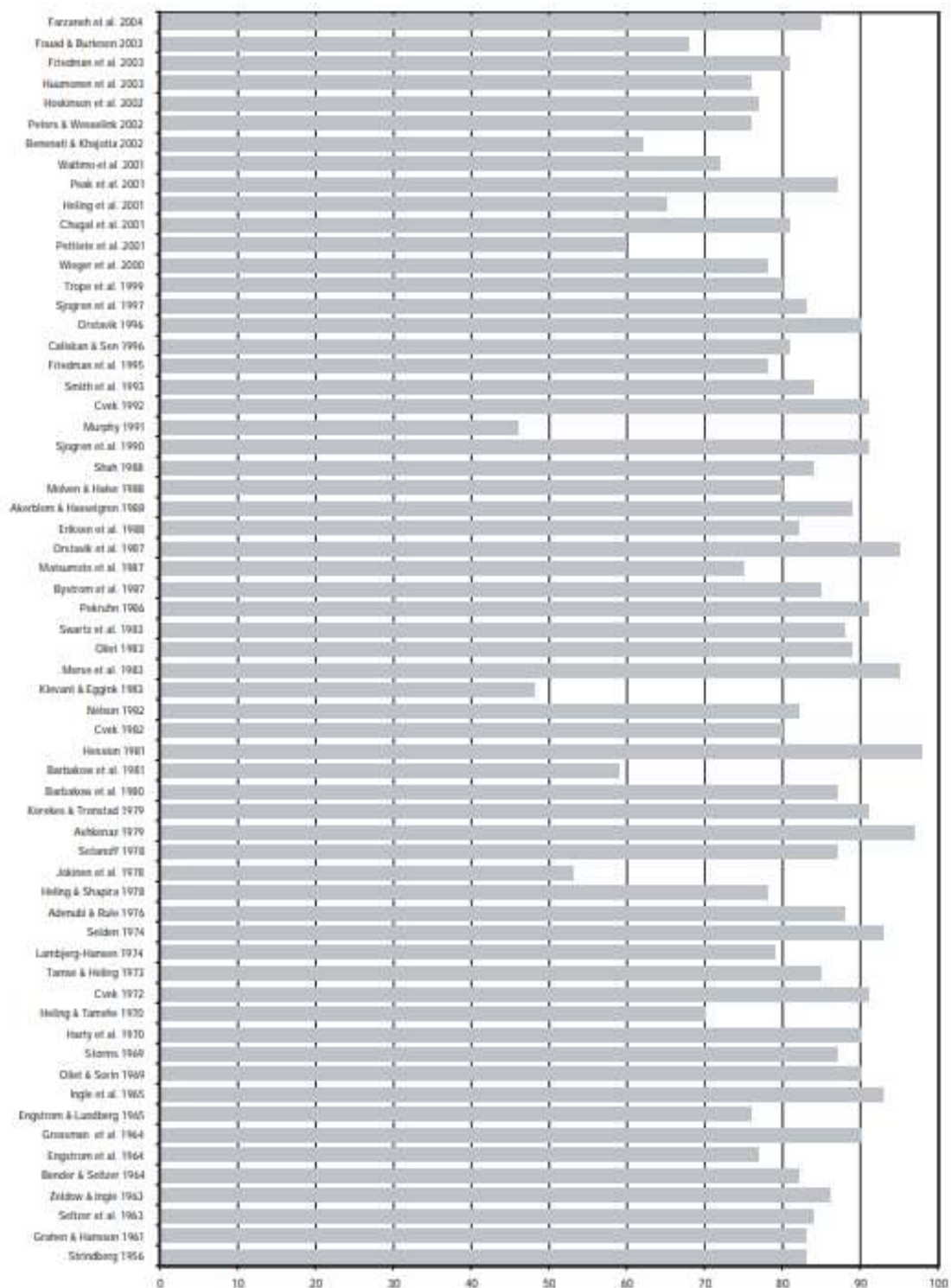


Figura 1. Representación gráfica de las tasas de éxito en porcentaje de estudios de seguimiento posteriores al tratamiento inicial con endodoncia, desde 1956 hasta 2004.

Tomado de: Friedman S, Mor C. (2004).

- Transoperatorios: A través del diagnóstico preoperatorio el clínico prepara un protocolo clínico con conocimiento para manejar factores y percances de procedimiento endodóntico ⁽²²⁾. Dentro de los cuales podríamos mencionar el nivel de instrumentación en la longitud de trabajo ya que es importante para la disminución de la carga bacteriana en toda la longitud del conducto radicular ya que se ha comprobado presencia importante de bacterias en los últimos 5 mm en conductos radiculares ^(23, 24). Una instrumentación deficiente conlleva a una obturación defectuosa la cual puede ocasionar la filtración de bacterias y posteriormente una mayor prevalencia de una infección periapical ^(25, 26). Accidentes de procedimiento tales como fracturas de instrumentos y perforación de raíz pueden dificultar la eliminación efectiva de bacterias en el sistema del conducto radicular lo cual posteriormente podría provocar una infección persistente y comprometería el resultado del tratamiento ⁽²⁷⁾.
- Postoperatorios: La calidad y oportuna restauración coronal de dientes tratados endodónticamente es un factor en el éxito del tratamiento de conducto radicular ⁽²⁸⁾. Se ha demostrado mayores probabilidades de fracaso endodóntico cuando existe una obturación adecuada con una restauración protésica inadecuada en comparación cuando la obturación es inadecuada y la restauración protésica adecuada ⁽²⁹⁾.

Independientemente de si el factor del fracaso endodóntico es preoperatorio, transoperatorio o postoperatorio o la suma de todos ellos, siempre el resultado será la aparición de filtraciones bacterianas e infecciones persistentes ⁽³⁰⁾.

Nair *et al.* ⁽³¹⁾ indican que las bacterias que causan infecciones persistentes comúnmente se alojan en áreas difícilmente accesibles para instrumentos y sustancias antimicrobianas, incluyendo conductos laterales, ramificaciones apicales e istmos constatándose también la invasión bacteriana en tubulillos dentinarios ^(32, 33).

2.2 Microbiología del conducto radicular

El pronóstico del tratamiento endodóntico está vinculado a la relación que existe con los microorganismos, ya que éstos son el origen de las infecciones pulpares. A diferencia de otros sitios en el cuerpo humano, el compartimento de la pulpa dental es completamente estéril, cuando existe una invasión microbiana se encuentran las condiciones ideales para el crecimiento microbiano los cuales son: temperatura, pH, la disponibilidad de nutrientes ^(34, 35). Por lo tanto, se puede mencionar que el objetivo del tratamiento de endodoncia es la eliminación o reducción de la población de microorganismos, evitar su reinfeción mediante la obturación y de la mano promover la curación de tejidos periapicales ^(31, 36).

Puesto que los microorganismos ejercen un rol determinante tanto en la patogenicidad y virulencia en las infecciones pulpares y periapicales es importante conocer sus principales vías de invasión, los cuales son a través de ⁽³⁷⁾:

- Exposición pulpar: se produce como resultado de un daño a la integridad del esmalte resultado de: caries, traumatismos, fisuras en el esmalte o procedimientos defectuosos de restauración.
- Tubulillos dentinarios: Se produce cuando el cemento está expuesto por consecuencia de una enfermedad periodontal o una iatrogenia.
- Enfermedad periodontal: los microorganismos del surco gingival pueden alcanzar la cámara pulpar a través de la membrana periodontal, utilizando conductos laterales o el foramen apical. Esta vía se vuelve disponible para los microorganismos durante una profilaxis dental, debido a la luxación dental.
- Anacoresis: Esta dada por la invasión microbiana a través de la sangre en la microcirculación pulpar.
- Contigüidad: los microorganismos pueden llegar a los conductos principales o laterales que migran de un diente infectado a una pulpa sana como consecuencia de la contigüidad de los tejidos, extendiendo así la infección a un diente adyacente.

Las infecciones endodónticas se pueden clasificar según su localización anatómica (infección intrarradicular o extrarradicular) ⁽³⁸⁾.

- Infección intrarradicular: Causadas por microorganismos que invaden el conducto radicular y se subdividen de acuerdo al momento en que las bacterias entran al sistema de conductos:
 - a. Infección primaria: Se da cuando los microorganismos invaden y colonizan el tejido necrótico de la pulpa en una primera vez.
 - b. Infección secundaria: Causada por microorganismos que son introducidos por el clínico en el conducto radicular en el momento transoperatorio sin que previamente existiera una infección primaria.
 - c. Infección persistente: Provocada por microorganismos de la infección primaria y secundaria que resistieron los procedimientos antimicrobianos dentro del conducto radicular y sobrevivieron a la escasez de nutrientes en los conductos tratados.
- Infección extrarradicular: Originada por la invasión microbiana a tejidos periapicales y es una secuela de la infección intrarradicular, sin embargo, en ocasiones puede llegar a ser independiente.

La evolución de la infección pulpar no tratada repercute en tejidos periapicales ya que estos inician un proceso de inflamación antes del desarrollo completo de la pulpa necrótica destruyendo tejido periapical ocasionada por la interacción de mecanismos de defensa (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas) y microorganismos mayormente anaerobios, posteriormente existe una reacción que da una acumulación de leucocitos a paredes vasculares provocando una extravasación de plasma al tejido conjuntivo el cual origina una inflamación generando presión en terminaciones locales que causan dolor. Sí no existe tratamiento adecuado el proceso inflamatorio en tejido periapical agudo evoluciona a una etapa crónica en la cual se forma el tejido de granulación resultado de un intento fallido del sistema inmune de reparar la lesión hasta encapsularlo en tejido

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

conjuntivo fibroso recubierto de un epitelio escamoso estratificado que contiene fluido y restos celulares, Figura 2 ⁽³⁹⁾.

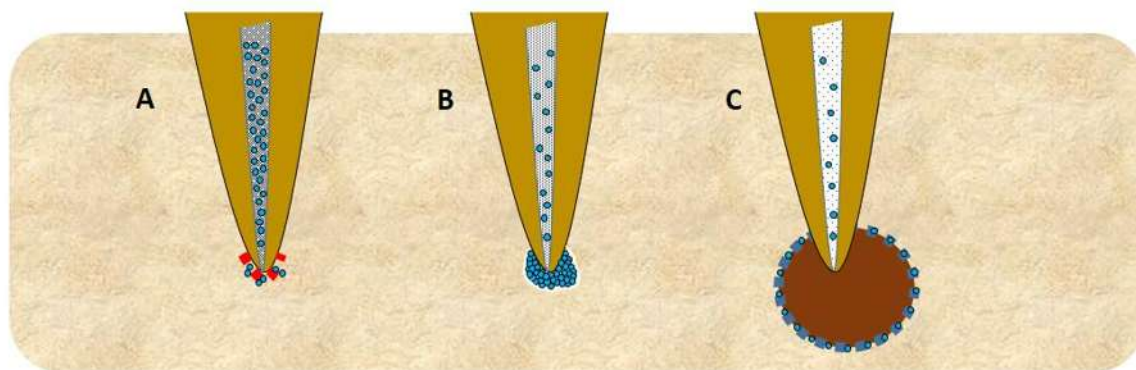


Figura 2: Fases de la patogénesis del quiste periapical: A) Inicio. B) Formación del quiste. C) Crecimiento.

Modificado de: Siqueira JF Jr. (2005).

Las infecciones endodónticas primarias son causadas por microorganismos que inicialmente invaden y colonizan el tejido pulpar necrótico. Estas infecciones (primarias) se caracterizan en su gran mayoría por ser un género de bacterias anaerobias y se componen de 10 a 30 especies según estudios moleculares. El número total de bacterias oscila de entre 10³ a 10⁸ células por conducto infectado.

Sin embargo, las especies bacterianas de la microbiota endodóntica muestran una gran variabilidad individual, es decir, cada individuo alberga un único microbioma endodóntico en términos de abundancia y dominancia de especies. Igualmente, se tiene evidencia que existe una diferencia en cuanto el número de especies que es mayor cuando la infección es sintomática (con lesión apical) en comparación de infecciones asintomáticas (sin lesión apical). Las especies bacterianas que se detectan con mayor frecuencia en las infecciones primarias, incluidos los casos con lesión apical, pertenecen a diversos géneros de: bacterias Gram negativas (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* y *Veionella*) y Gram positivas (*Parvimonas*, *Filifactor*,

Pseudoramibacter, Olsenella, Actinomyces, Peptoestreptococcus, Streptococcus, Propionibacterium y *Eubacterium*)^(40, 41).

Las infecciones secundarias están relacionadas al material contaminado usado durante los procedimientos, en un artículo reciente de Koller et al.⁽⁴²⁾ Se encontró en paquetes nuevos de materiales de uso en endodoncia (puntas de gutapercha, diques de hule, losetas de papel, y esponjas de instrumentos endodónticos) contaminación y las especies bacterianas más comunes fueron: *Propionibacterium, Staphylococcus* y *Micrococcus*. El almacenamiento prolongado de estos materiales puede llegar a incrementar el nivel de contaminación de estos materiales y tendrían que ver el pronóstico del tratamiento endodóntico.

En las infecciones persistentes estudios concuerdan que las bacterias que resisten los procedimientos terapéuticos frecuentemente son más las bacterias Gram positivas facultativas como: *Streptococcus, P. micra, Actinomyces, Propionibacterium, P. alactolyticus, lactobacilos, Olsenella uli* y *E. faecalis*, lo que muestra que las bacterias Gram positivas pueden ser más resistentes a los procedimientos antimicrobianos y que podrían tener la capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales más adversas en los conductos radiculares instrumentados y medicados^(30, 43).

2.3 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis es un coco Gram positivo anaerobio facultativo que puede aparecer solo, en pares o en cadenas; estas bacterias pueden tener forma de coco-bacilos. Cuando se realiza la tinción de Gram es uno de los huéspedes más normales del tracto gastrointestinal humano y animal. Son responsables de una variedad de infecciones humanas que incluyen bacteriemia, endocarditis infecciosa, infecciones del tracto urinario e infecciones periapicales ya que tienen la capacidad de adquirir resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles actualmente y plantean un desafío terapéutico importante^(44, 45).

El *E. faecalis* tiene varias ventajas para adaptarse y sobrevivir en condiciones hostiles con poca cantidad de oxígeno y nutrientes, pero sobre todo a diferencia de

**EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES IN VITRO**

otras bacterias en presencia de ambientes alcalinos producidos por el hidróxido de calcio el medicamento intraconducto más empleado ⁽⁴⁶⁾. De igual manera se comprobó que puede evadir los procedimientos biomecánicos (instrumentación e irrigación) en los conductos radiculares introduciéndose y colonizando hasta una profundidad de 300 micras dentro de los túbulos dentinarios y ser causante de lesiones persistentes ⁽³³⁾. Esto puede ser una de las principales razones por las que el *E. faecalis* se correlaciona más con infecciones persistentes en comparación con infecciones primarias, como se muestra en la Tabla 2 ^(47, 48).

Tabla 2: Estudios de investigación de la prevalencia de *E. faecalis* en dientes que presentan periodontitis apical

| Autor/año | Numero de raíces obturados en dientes estudiados | Número de raíces obturadas de dientes con crecimiento bacteriano | Prevalencia de <i>E. faecalis</i> | Método de detección |
|----------------------------------|---|---|--|----------------------------|
| Engström 1964 | 54 | 21 | 5/21 = 24% | Cultivo |
| Moller 1966 | 264 | 120 | 34/120 = 28% | Cultivo |
| Molander et. al 1988 | 100 | 68 | 32/68 = 47% | Cultivo |
| Sundqvist et. al 1998 | 54 | 24 | 9/24 = 38% | Cultivo |
| Peciuliene et. al 2000 | 25 | 20 | 14/20 = 70% | Cultivo |
| Peciuliene et. al 2001 | 40 | 33 | 21/33 = 64% | Cultivo |
| Hancock et. al 2001 | 54 | 33 | 10/33 = 33% | Cultivo |
| Pinheiro et. al 2001 | 60 | 51 | 27/51 = 53% | Cultivo |
| Pinheiro et. al 2003 | 30 | 24 | 11/24 = 46% | Cultivo |
| Siqueira & Roças 2004 | 22 | 22 | 17/22 = 77% | PCR |
| Gomes et. al 2004 | 19 | 19 | 6/19 = 32% | Cultivo |
| Roças et. al 2004 | 30 | 30 | 20/30 = 67% | PCR |

Tomado de: Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. (2006).

2.4 Biofilm

Las comunidades microbianas que coexisten e interaccionan en un hábitat determinado se conocen comúnmente como biofilms. Estas comunidades se encuentran asociadas a infecciones en humanos, pero también las podemos encontrar en ambientes naturales (ríos, arroyos o suelo) y ambientes artificiales (tinacos, tuberías). El biofilm se define como un conjunto de células microbianas que se adhieren firmemente a una superficie envueltas en una matriz de material extracelular principalmente polisacárido, dependiendo de la especie involucrada, la microcolonia puede estar compuesta por 10-25% de células bacterianas y 75-90% de matriz de sustancias poliméricas extracelulares ^(49, 50).

Alrededor del 80% de las infecciones humanas son causadas por microorganismos que se encuentran en forma de biofilm beneficiándose de protección frente a respuesta inmune del huésped, medicamentos antimicrobianos, Intercambio genético, defensa frente a microorganismos competidores y favoreciéndose de tener un hábitat más amplio y variado para su crecimiento por tal razón su grado de patogenicidad es mayor que en microorganismos en estado planctónico ^(51, 52).

El proceso de formación de biopelículas es una evolución en el que las células de los microorganismos se transforman del modo planctónico al sésil ⁽⁵³⁾. El proceso de formación de biopelículas se produce a través de una serie de eventos que conducen a la adaptación en diversas condiciones nutricionales y ambientales.

Svensater y Bergenholtz ⁽⁵⁴⁾ propusieron una hipótesis para explicar la formación de biopelículas en los conductos radiculares que consta de 4 fases, como se muestra en la figura 3:

- Acondicionamiento de la superficie: Esta fase se da cuando las primeras bacterias en suspensión desprenden mayormente proteínas y polisacáridos sobre la superficie de la dentina en el conducto radicular.
- Adhesión: La formación de microcolonias tiene lugar después de que las bacterias se adhieren a la superficie de la dentina en el conducto radicular.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

- Crecimiento: Cuando la población de la colonia aumenta (detección de quórum), se producen biofilms. Los nutrientes se difunden en la matriz. Otras especies bacterianas secundarias se incorporan dentro de la biopelícula. La proximidad de la especie facilita el intercambio de material genético.
- Separación: Luego de que el biofilm ha alcanzado la madurez, algunas bacterias se liberan de la matriz para poder colonizar nuevas superficies.

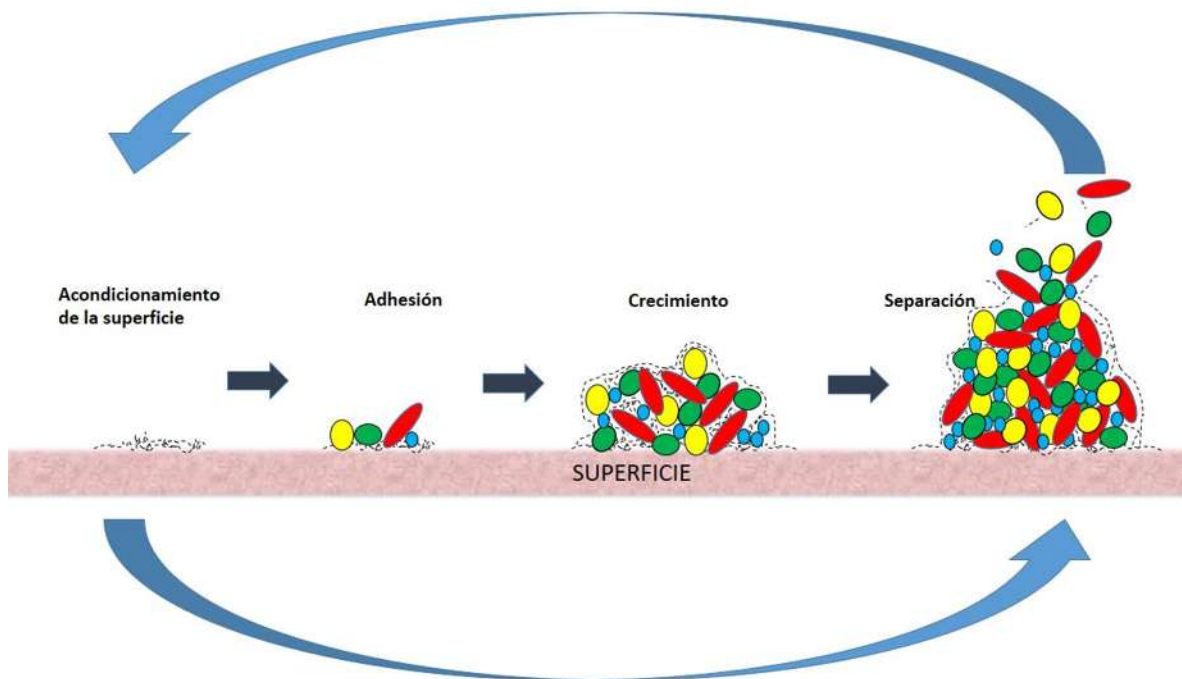


Figura 3. Desarrollo de una biopelícula de múltiples especies a lo largo del tiempo. (1) Acondicionamiento de la superficie, (2) Adhesión inicial de las células bacterianas, (3) Crecimiento y maduración del biofilm (4) Separación.

Modificado de: Svensäter G, Bergenholtz G. (2004).

Investigaciones que prueban antimicrobianos para el campo endodóntico habitualmente emplean células bacterianas en formas planctónicas lo cual no caracteriza las condiciones en las que se encuentran *in vivo* ya que los

microorganismos se organizan en forma de biofilm por tal razón son más resistentes y difíciles de erradicar con antimicrobianos ⁽⁵⁵⁾. Se tiene evidencia que para combatir la infección de microorganismos en biofilms se requieren antibióticos en concentraciones de 100 a 1000 veces mayores que en bacterias en forma planctónica ⁽⁵⁶⁾.

2.5 Quorum sensing

Durante la formación del biofilm, muchas especies de bacterias se pueden comunicar entre sí a través de un mecanismo llamado quórum sensing ⁽⁵⁷⁾. El quórum sensing fue descubierto y descrito hace más de 25 años observando especies bacterianas marinas, *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*. En ambas especies se observó que estas enzimas son responsables de la producción de luz y se determinó que la emisión de luz solo ocurre a una alta densidad de población celular en respuesta a la acumulación de un autoinductor secretado por moléculas de señalización ⁽⁵⁸⁾.

Anteriormente se tenía la creencia que las bacterias rara vez interactúan entre ellas y que sus funciones eran individuales. Actualmente, se conoce que las bacterias cooperan entre sí teniendo la capacidad de desarrollar mecanismos y formas de comunicación ⁽⁵⁹⁾. Esta comunicación o señalización intercelular regula la expresión genética de una forma dependiente de la densidad celular. Este sistema faculta a las bacterias para que se comporten colectivamente como un grupo, es decir como si fueran un solo organismo multicelular (sin necesariamente ser un tejido) ya que mantienen una comunicación permanente entre ellas, dentro de los diferentes ambientes o microambientes donde permanecen y conviven. Los mecanismos de comunicación, le permiten reconocer cuando se alcanza el umbral o nivel de presencia, para desarrollar nuevas funciones ⁽⁶⁰⁾.

2.6 Preparación biomecánica

La preparación biomecánica es la fase esencial del tratamiento endodóntico ya que se encarga del desbridamiento y después, a medida que se desbrida se conforma el conducto radicular, creando así el espacio que permite que irrigantes y medicamentos antibacterianos puedan erradicar las bacterias y eliminar los subproductos bacterianos, para posteriormente ser obturado ^(61, 62).

El desbridamiento de los conductos se realiza utilizando medios mecánicos, físicos y químicos de manera sincronizada:

- Químico: Con el efecto antibacteriano del hipoclorito de sodio.
- Mecánico: Con los instrumentos que se introducen dentro del espacio pulpar para retirar material.
- Físicos: Ocurre cuando con el eyector aspiramos el material orgánico y el hipoclorito de sodio.

Hülsmann *et. al.* ⁽⁶²⁾ en su publicación resalta la importancia de la limpieza, es decir, la eliminación de todo contenido orgánico de todo el espacio del conducto radicular con instrumentos e irrigación abundante y citó la frase de Schilder “lo que sale es tan importante como lo que entra” (Pag. 34). Los objetivos que se han propuesto para la preparación biomecánica pueden ser divididos en:

- Objetivos biológicos:
 - a. Limitar la instrumentación al interior del conducto.
 - b. Evitar la extrusión de material infectado más allá del foramen apical.
 - c. Eliminación de todos los irritantes en el interior de los conductos radiculares.
 - d. Crear espacio para permitir la introducción de la irrigación y medicamentos.
- Objetivos Mecánicos:
 - a. Preparar una sólida matriz de dentina apical a nivel de la unión entre la dentina y cemento.

- b. El conducto debe estar preparado divergente hacia coronal y convergente en dirección apical con el diámetro más pequeño a nivel de su terminación apical.
- c. Mantener la integridad del foramen tanto en su anatomía como posición.
- d. El foramen apical debe mantenerse tan pequeño como sea posible eliminando los restos producidos por los procesos de conformación.

A pesar de que la preparación biomecánica pretende el desbridamiento absoluto Ove Peters *et al.* ⁽⁶³⁾ afirman que difícilmente la sola preparación biomecánica logra eliminar por completo los microorganismos del conducto, ya que se ha comprobado que la instrumentación mecánica deja aproximadamente del 35% al 40% de las paredes del conducto radicular sin tocar, de igual manera se ha demostrado que no todos los protocolos de irrigación penetran los túbulos dentinarios a las mismas profundidades ⁽⁶⁴⁾. Debido a esto es necesario auxiliarnos de la medicación intraconducto “cuando el caso así lo requiera” para eliminar microorganismos.

2.7 Medicación intraconducto

La medicación intraconducto es cualquier agente con acción farmacológica antibacteriana que queda en el espacio del conducto radicular en un periodo prolongado para ejercer sus efectos contra microorganismos que escaparon de los efectos de la preparación biomecánica ya que sus efectos se limitan principalmente al conducto principal ⁽⁶⁵⁾.

Anil Kishen propone una serie de requisitos para un medicamento intraconducto antibacteriano de uso tópico ⁽⁶⁶⁾:

- Requisitos primarios: Desbridar y desinfectar el sistema de conductos eliminando biofilm de bacterias y hongos e inactivar los productos de virus y bacterias.
- Requisitos secundarios: Fluir en todo el espacio del conducto radicular y penetrar en túbulos dentinarios, proveer un efecto antibacteriano por largo tiempo (sustantividad), no producir efectos adversos en la dentina o en la

capacidad de adhesión de materiales restaurativos, no producir efectos citotóxicos en tejidos periapicales.

Existen numerosas sustancias que a través de los años han sido propuestas como medicamentos intraconducto para uso entre citas, todas ellas con diferentes características, así como ventajas y desventajas.

Sustancias utilizadas como medicación intraconducto.

- **Clorhexidina:** Su principal característica y ventaja de esta sustancia es la sustantividad que le confiere una capacidad antibacteriana de largo plazo previniendo colonización bacteriana posterior ⁽⁶⁷⁾. Sus desventajas principales serian su poca penetración a túbulos dentinarios y por consiguiente falta de eliminación bacteriana, la pigmentación dental debido a su color y que al mezclarse con hipoclorito de sodio forma *paracloroanilina* ^(68, 69, 70).
- **Haluros (Hipoclorito de sodio):** Tiene un amplio espectro antimicrobiano ya que es eficiente tanto para bacterias como para hongos como *Candida albicans*. Es capaz de disolver material orgánico y biofilms bacterianos ^(71, 72, 73). Sus desventajas serian reacciones irritantes cuando se extruye hacia tejidos blandos causando desde inflamación hasta necrosis de tejidos periapicales ⁽⁷⁴⁾.
- **Compuestos Fenólicos (*eugenol, paramonoclorofenol alcanforado, paraclorofenol, paraclorofenol alcanforado, cresol, creosota, timol*):** Los fenoles tienen una alta volatilidad, lo que puede mejorar su penetración a lugares donde la preparación biomecánica no logra llegar ⁽⁷⁵⁾. Su desventaja es que algunos compuestos como paramonoclorofenol alcanforado suelen ser tóxicos ⁽⁷⁶⁾.
- **Aldehídos (formaldehido, paraformaldehido, glutaraldehido):** Son antibacterianos eficientes, pero sumamente tóxicos en contacto con tejidos periapicales actualmente están en desuso en la terapia endodóntica ⁽⁷⁷⁾.

- **Antibióticos (pasta triantibiótica):** Tiene una eficacia bactericida de amplio espectro, sin embargo, el desarrollo de resistencia bacteriana y la coloración dental son los posibles inconvenientes de esta técnica ⁽⁷⁸⁾.

Se han usado muchos medicamentos en un intento de lograr mejores resultados en cuanto a la eliminación bacteriana, pero no se ha encontrado ninguno que sea completamente efectivo. No obstante, el medicamento de elección más utilizado durante décadas y con mejores resultados es el hidróxido de calcio ⁽⁷⁹⁾.

2.8 Hidróxido de calcio Ca(OH)_2

La primera referencia que se tiene sobre el uso de hidróxido de calcio fue para el tratamiento de “*fistula dentalis*” y fue realizada por Nygren en 1838. Posteriormente fue utilizado para la curación de pulpa dañada por Codman en 1851. Pero fue hasta 1920 que se introdujo formalmente a la odontología y fue estudiado y dado a conocer por Hermann ⁽⁸⁰⁾.

El hidróxido de calcio tiene por fórmula química Ca(OH)_2 , es un polvo blanco que tiene la propiedad de liberar iones calcio e hidroxilo lentamente lo cual es muy útil en el campo de la endodoncia ya que se necesita un periodo prolongado de acción del medicamento que se requiere esté en contacto con tejidos y esto se puede obtener gracias a la baja solubilidad del hidróxido de calcio, además tiene un pH de 12.5 a 12.8 lo que genera un ambiente básico fuerte ⁽⁸¹⁾.

El hidróxido de calcio es empleado de diferentes maneras en endodoncia y dependiendo de su uso este tendrá un modo de acción diferente. En cuanto al efecto antibacteriano del hidróxido de calcio no se sabe a ciencia cierta cuál es el principal mecanismo de acción, Siqueira *et. al.* ⁽⁸²⁾ mencionaron posibles efectos de su mecanismo de acción:

- La destrucción de la membrana celular bacteriana: La pared celular bacteriana tiene una capa fosfolipídica, los átomos de hidrógeno de esta capa son destruidos por los iones hidroxilo con esto se generan radicales libres lipídicos que producen una reacción en cadena autocatalítica.

- La desnaturalización proteica: En presencia de hidróxido de calcio el ambiente se torna alcalino y esto produce una ruptura en los enlaces iónicos de las proteínas de las células bacterianas.
- El daño del ADN bacteriano: El hidróxido de calcio genera la separación de los filamentos de ADN y con esto suprime la replicación celular.

Se considera que el hidróxido es un medicamento panacea en endodoncia ya que tiene múltiples usos. Sin embargo, como antibacteriano tiene un efecto limitado ya que no afecta a todas las especies de la microbiota endodóntica. Además, las propiedades fisicoquímicas limitan su efectividad de desinfección en todo el sistema de conductos a corto plazo ⁽⁸³⁾.

Esta es la razón por la cual se considera la necesidad de buscar alternativas para abordar este desafío en el campo endodóntico (eliminación de microorganismos dentro del sistema de conductos radiculares). En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías que pueden ofrecer mejoras en la terapia endodóntica ⁽⁸⁴⁾.

2.9 Nanotecnología

La nanotecnología se encarga del conocimiento y manejo de la materia en dimensiones entre 1 y 100 nanómetros (nm), donde materiales a estas escalas potencializan sus propiedades y permiten nuevas aplicaciones ⁽⁸⁵⁾. Un nanómetro equivale a (10^{-6} mm), es decir 1 nanómetro es un millón de veces más pequeño que un milímetro y este término “nanómetro” fue propuesto por primera vez por Richard Zsigmondy cuando observó y midió el tamaño de partícula de oro coloidal usando un microscopio ⁽⁸⁶⁾.

En la mitad de siglo XX Richard Feynman, presentó una conferencia llamada "Hay mucho espacio en el fondo" en el Congreso de la Sociedad Americana de Física de 1959 en Caltech, en el cual introdujo la idea de manipular la materia a escala atómica. Por esta razón es considerado el padre de la nanotecnología moderna ⁽⁸⁷⁾. Sin embargo, no fue hasta principios de los años 80's donde este concepto de

manipulación de la materia se pudo llevar a cabo en conjunto con el desarrollo de microscopios que permitieron analizar estructuras a nanoescala.

Actualmente la nanotecnología ha cumplido con sus objetivos de fortalecer, innovar y crear nuevas propiedades en materiales, esta tecnología se ha desarrollado considerablemente en diferentes campos (medicina, industrias de electrónica, química, aeroespacial, productos de consumo como cosméticos y artículos deportivos) ^(88, 89). Es por ello que nos encontramos en un entorno donde la exposición de nanomateriales con humanos podría darse a través de vías dérmicas, orales y respiratorias razón por la cual surgió la preocupación de los efectos secundarios que pueda traer ya que se tiene conocimiento que la toxicología de nanomateriales difiere con la de materiales a macro escala, por tal motivo surgieron disciplinas específicas, la nanotoxicología que estudia posibles efectos adversos para la salud, y la nanomedicina que se encarga del desarrollo y estudio de beneficios y riesgos de nanomateriales en administración de fármacos, recubrimientos antibacterianos de dispositivos médicos, reducción de la inflamación, mejor curación del tejido quirúrgico y detección de células cancerosas ^(90, 91, 92).

Respecto a la toxicidad de los nanomateriales existen mecanismos que son los que determinan el grado de toxicidad y los podemos clasificar en ⁽⁹³⁾:

- Propiedades generales (físicas): Tamaño, forma, aglomeración y superficie específica.
- Propiedades específicas (químicas): banda de energía prohibida, disolución de química, defectos superficiales.

Regularmente los protocolos que evalúan la toxicidad incluyen: inducción de oxígeno reactivo, carga catiónica y disolución de metales pesados. A pesar de que existen estos protocolos, las diferencias casi infinitas de las propiedades físico-químicas de los nanomateriales dan una forma diferente de toxicidad, debido a esta gran diversidad de propiedades no existe un protocolo universal que evalúe la toxicidad ya que se tendrían que realizar pruebas específicas para cada aplicación,

con lo cual existiendo una gran cantidad de factores es casi imposible ya que tomaría mucho tiempo y es demasiado costoso, incluso las pruebas que se han realizado en modelos *in vitro* no garantizan una fiabilidad ya que estos resultados al extrapolarlos a modelos *in vivo* provocan más lagunas en cuanto al conocimiento de toxicidad ya que dependería de la respuesta biológica del huésped. Es por ello que actualmente no existe una enfermedad en humanos que pueda estar directamente relacionada con la exposición a nanomateriales, sin embargo, sirven para hacer una hipótesis de posibles resultados adversos ^(93, 94).

Aunque la naturaleza de los nanomateriales es compleja ya que se ha dificultado su evaluación toxicológica, el futuro de la nanotecnología parece bastante prometedor motivados del deseo de explotar sus propiedades para solucionar y dominar problemas en diferentes áreas del campo biomédico, y en específico en el campo de la endodoncia beneficiándose de la aplicación de nanopartículas de plata antibacterianas en la desinfección de los sistemas de conductos radiculares ^(91, 95).

2.9.1 Nanopartículas de plata

Debido a sus propiedades diversas, la plata ha tenido varias aplicaciones a través de la historia (joyería, elaboración de monedas, fotografía, agente microbicida, cables para electricidad y fabricación de instrumentos musicales). En este apartado nos enfocaremos en la propiedad antimicrobiana de la plata empleada desde la antigüedad, así como sus usos en la época moderna ⁽⁹⁶⁾.

Se tiene evidencia de los usos de las propiedades antibacterianas de la plata (de manera empírica) desde mucho antes del descubrimiento de los microorganismos causantes de infecciones. Los persas usaban recipientes de plata para potabilizar agua, de igual manera los griegos, los romanos y los egipcios usaban la plata para la conservación del agua y la comida. Esta capacidad antibacteriana causó que Hipócrates empleara la plata para el tratamiento de úlceras y promover la curación de la herida ⁽⁹⁷⁾.

Al inicio del siglo XX la plata tuvo su mayor auge utilizándola como apósitos para heridas y prevenir infecciones. Entre 1900 y 1940 decenas de miles de pacientes

consumieron plata coloidal, y varios millones de dosis de plata fueron administradas por vía intravenosa. Sin embargo, con la aparición de los antibióticos el uso de la plata como medicamento antimicrobiano fue en declive ⁽⁹⁷⁾.

En los años sesenta, Moyer 1965 ⁽⁹⁸⁾ introdujo el uso del nitrato de plata para el tratamiento de quemaduras, indicaba que la solución no interfería en la proliferación del tejido epidérmico y poseía propiedades antibacterianas *contra S. aureus, P. aeruginosa* y *E. coli*. Posteriormente el nitrato de plata fue combinado con sulfamida para formar una crema que sirve como agente antibacteriano *contra E. coli, S. aureus, Klebsiella spp* y *Pseudomonas spp*.

Actualmente con la aparición de bacterianas patógenas que poseen una resistencia a los antibióticos, el mundo médico necesita nuevas tecnologías que le permitan combatir la infección eficazmente, las nanopartículas de plata son un agente antimicrobiano prometedor ya que poseen una actividad bactericida muy alta contra una amplia gama de microbios y parásitos incluso cuando se usan dosis bajas, esta propiedad “oligodinamica” le da cierta ventaja frente a otro antimicrobianos, otro de los beneficios de la plata como agente microbicida es la baja probabilidad de desarrollar resistencia por parte de los microorganismos en comparación con los antibióticos debido a su mecanismo de acción ⁽⁹⁹⁾.

Aún existen dudas sobre el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata sobre las bacterias, la teoría más aceptada es que la plata actúa sobre múltiples objetivos de la célula bacteriana la cual inicia con la atracción electrostática de la carga negativa de la bacteria y la carga positiva de las nanopartículas de plata, su propiedad bactericida se da a partir de la interacción con los grupos sulfhidrilo de proteínas y ADN. Al unirse las nanopartículas de plata con la membrana celular interfieren con la permeabilidad y respiración, por otro lado, se interrumpe el transporte de nutrientes por las enzimas y la bacteria pierde la capacidad de replicación de su ADN como se muestra en la figura 4 ^(99, 100, 101).

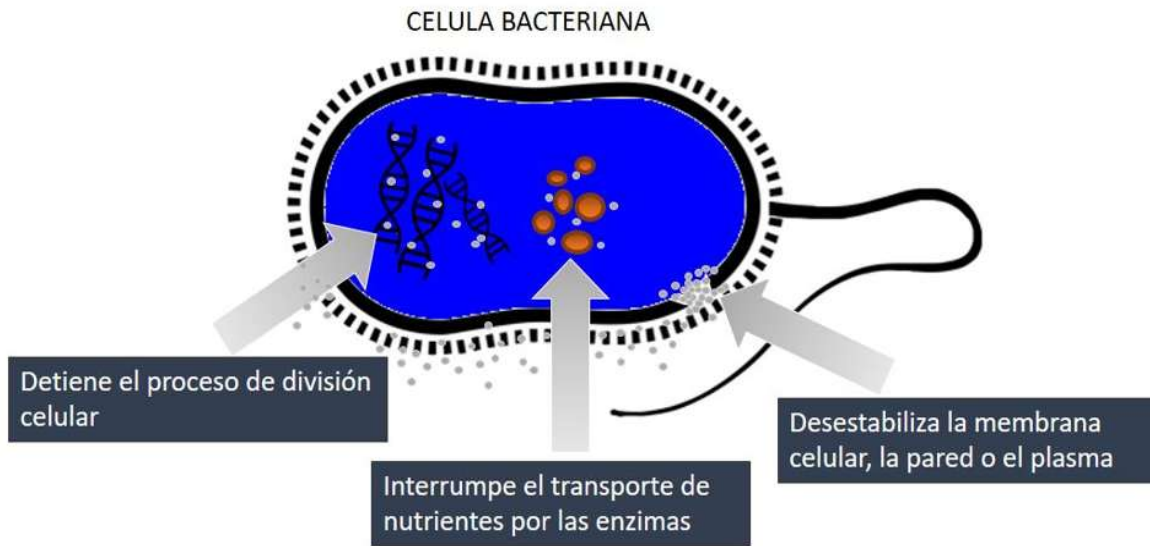


Figura 4: Mecanismo de acción antimicrobiano de las Ag-Np

Modificado de: Franci, Falanga, Galdiero, Palomba, Rai, Morelli, Galdiero. (2015).

3. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

Actualmente se sabe que el biofilm microbiano juega un papel determinante en el éxito del tratamiento endodóntico. Por consiguiente, este tratamiento va encauzado a la eliminación minuciosa del biofilm dentro de los conductos radiculares. La nanotecnología implica la adaptación de materiales a nivel atómico para obtener propiedades únicas, que pueden ser manipuladas adecuadamente para las aplicaciones deseadas y en la odontología no es la excepción. Los nanomateriales se encuentran en constante investigación, las nanopartículas de plata en algunos casos se han incorporado a productos de restauración dental, material endodóntico, implantes dentales y solución inhibitoria de la caries ^(102, 103).

El estudio del doctor Wu. *et. al.* ⁽¹⁰⁴⁾ tuvo como propósito evaluar diferentes aplicaciones de desinfección con nanopartículas de plata (irrigante y medicación intraconducto) contra un biofilm de *E. faecalis* crecido en conductos radiculares extraídos. Como irrigante las nanopartículas de plata al 0.1% fueron evaluadas contra hipoclorito de sodio al 2% y solución salina estéril, al obtener resultados se comprobó que el grupo de las nanopartículas de plata y el grupo de solución salina estéril eran similares y no tuvieron efecto bactericida contra el biofilm bacteriano. Por otra parte, para la evaluación como medicación intraconducto se empleó un modelo en gel de nanopartículas de plata del cual se obtuvieron dos concentraciones (0.02% y 0.01%) las cuales fueron comparadas contra hidróxido de calcio y solución salina estéril como grupo control, utilizando microscopio electrónico de exploración de campo y tinción con fluorescencia para su evaluación, se observó mayor eliminación bacteriana del grupo de gel de nanopartículas de plata al 0.02%. Esta investigación señala una mayor eficacia antibacteriana de las nanopartículas de plata como medicación intraconducto ya que existe mayor interacción prolongada de las cargas positivas de las nanopartículas con las cargas negativas del biofilm bacteriano y por ende mayor muerte celular.

Javidi *et. al.* ⁽¹⁰⁵⁾ evaluaron la eficacia bactericida del hidróxido de calcio utilizando como vehículo nanopartículas de plata contra *E. faecalis* en dientes extraídos. Los grupos que se compararon fueron tres: 1) hidróxido de calcio solo con agua estéril como vehículo, 2) hidróxido de calcio con nanopartículas de plata como vehículo y 3) agua estéril (como control negativo). Se obtuvieron resultados del día 1 y día 7 posteriores a la medicación intraconducto, determinándose la evaluación antimicrobiana mediante el número de unidades formadoras de colonias en el día 1 el grupo del hidróxido de calcio con nanopartículas de plata como vehículo tuvo mayor efecto antimicrobiano en comparación con el grupo del hidróxido de calcio con agua estéril como vehículo. Al día 7 el grupo de hidróxido de calcio con agua estéril aumento su propiedad bactericida a pesar de ello no hubo diferencia estadísticamente significativa comparada con el grupo de hidróxido de calcio con nanopartículas de plata. En esta investigación se observa que el mecanismo de acción antimicrobiano alcanzo su máxima eficacia a partir del primer día al combinar el hidróxido de calcio con nanopartículas de plata.

Por su parte Afkhami *et. al.* ⁽¹⁰⁶⁾ realizaron una investigación en la cual su objetivo fue evaluar la actividad antibacteriana del hidróxido de calcio con diferentes vehículos contra *E. faecalis* crecido en dientes extraídos a diferentes periodos de tiempo. Los grupos experimentales se dividieron en: 1) hidróxido de calcio con solución salina normal, 2) hidróxido de calcio con clorhexidina, 3) hidróxido de calcio con nanopartículas de plata y 4) solución salina como control. El primer periodo a evaluar fue a los 7 días posteriores a la medicación intraconducto en la cual todos los medicamentos disminuyeron significativamente el número de colonias formadas en comparación con el grupo control, sin embargo, la combinación del hidróxido de calcio y nanopartículas de plata fue el medicamento más efectivo. Posteriormente, la segunda evaluación se realiza un mes después de la medicación intraconducto en la cual no existió diferencia significativa en el efecto antibacteriano del hidróxido de calcio con los diferentes vehículos.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

La investigación de Alabdulmohsen *et. al.* ⁽¹⁰⁷⁾ tuvo como objetivo evaluar el efecto bactericida de diferentes modelos de medicación intraconducto frente a *E. faecalis*. Se dividieron 5 grupos: 1) hidróxido de calcio, 2) gel de nanopartículas de plata, 3) hidróxido de calcio con nanopartículas de plata como vehículo, 4) control positivo y 5) control negativo. Los periodos de evaluación fueron a los 7 y 14 días posteriores a la medicación intraconducto y se evaluó por contabilidad de unidades formadoras de colonias, a los 7 días los resultados de mayor reducción bacteriana fueron en este orden hidróxido de calcio solo 81.5% de reducción, combinación de hidróxido de calcio y nanopartículas de plata 56.3% y el grupo que menor reducción presentó fue el del gel de nanopartículas con 32.9%, por su parte no se detectó crecimiento bacteriano en el grupo negativo. A los 14 días de exposición antimicrobiana el grupo con mayor porcentaje de reducción fue el del hidróxido de calcio solo con un 98.5% seguido de la combinación del hidróxido de calcio con las nanopartículas de plata con 85.4% y el grupo de gel de nanopartículas de plata solo presentó una reducción del 56.5%. Esta investigación evidenció que al combinar estos agentes antimicrobianos (hidróxido de calcio con nanopartículas de plata) puede resultar una acción antagónica.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los microorganismos son los principales agentes etiológicos de las enfermedades pulpares y periapicales, la desinfección del conducto radicular es de suma importancia para una exitosa eliminación de la flora microbiana, es la única garantía para el éxito final del tratamiento endodóntico. Se han empleado diferentes medicamentos intraconducto antibacterianos en los cuales se ha comprobado que no siempre cumplen su función biocida. La desinfección del sistema de conductos radiculares se ha mantenido siempre como un reto para el clínico en el campo de la endodoncia (2, 64, 65, 66, 82, 83).

Debido a esta problemática, es necesario ayudarnos de las nuevas tecnologías para contar con agentes antimicrobianos de amplio espectro para mejorar el pronóstico del tratamiento endodóntico. Actualmente, se cuenta con la posibilidad de incorporar la nanotecnología a fármacos y recubrimientos antibacterianos a dispositivos médicos mediante la agregación de nanopartículas de plata (89,90, 91).

La incorporación de nanopartículas bactericidas, como las Ag-NP, como medicación intraconducto podrían disminuir la cantidad de bacterias localizadas en los conductos radiculares, prevenir la recolonización bacteriana, recontaminación de conductos, así como evitar el crecimiento de bacterias residuales.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata sobre *Enterococcus faecalis*?

6. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la efectividad que muestran los diferentes medicamentos intraconducto utilizados en la terapia de conductos, existen inquietudes con respecto a los tratamientos endodónticos fallidos, donde se denota la persistencia de microorganismos específicos involucrados manifestándose en la recurrencia de lesiones periapicales después de un tratamiento. Existen diferentes estudios donde se comparan la actividad antimicrobiana de diferentes medicamentos intraconducto ampliamente utilizados. Además, orientados principalmente a erradicar *Enterococcus faecalis* de los tratamientos endodónticos fallidos (68, 71, 76). Actualmente la literatura muestra poca evidencia sobre la acción antibacteriana que las nanopartículas de plata en una presentación de gel tienen sobre *Enterococcus faecalis* organizado en biofilm dentro de los túbulos dentinarios (104, 107). Por esta razón, se realizó mediante el presente trabajo la búsqueda de un medicamento intraconducto alternativo con nanopartículas Ag-NP inmersas en un modelo en gel frente *E. faecalis*.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antibacteriano de un modelo de medicamento en gel con nanopartículas de plata como medicamento contra *Enterococcus faecalis* presente en las paredes del conducto radicular.

7.2. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria y bactericida de nanopartículas de plata contra *Enterococcus faecalis*.
2. Desarrollar una formulación en un modelo de medicamento en gel con nanopartículas de plata para uso intraconducto en un órgano dental.
3. Establecer las condiciones óptimas de manipulación del modelo de medicamento en gel de nanopartículas de plata para mantener sus propiedades físico-químicas.

8. HIPÓTESIS

H1: Las nanopartículas de plata poseen actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Enterococcus faecalis* como tratamiento de medicación intraconducto en órganos dentales.

H0: Las nanopartículas de plata no tienen actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Enterococcus faecalis* como tratamiento de medicación intraconducto en órganos dentales.

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo a los principios de la declaración De Helsinki de la Asociación Médica Mundial (en su 48° Asamblea general de Octubre del 2000) y vertidos en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación, capítulo II: De la investigación farmacéutica, artículo 65: actividades científicas tendientes al estudio de medicamentos y productos biológicos para uso en humanos, respecto de los cuales no se tenga experiencia previa en el país, que no hayan sido registrados por la Secretaría y, por lo tanto, no sean distribuidos en forma comercial, así como los medicamentos registrados y aprobados para su venta, cuando se investigue su caso con modalidades, indicaciones, dosis o vías de administración diferentes de las establecidas, incluyendo en empleo en combinaciones. Título cuarto: de la Bioseguridad de las Investigaciones, capítulo I: De la Investigación con Microorganismos Patógenos o Material Biológico que pueda contenerlos, en su artículo 75: instalaciones, equipo, adiestramiento, manual de procedimientos, vigilancia del área para el manejo de microorganismos patógenos; artículo 76: laboratorio de microbiología y artículo 77: seguridad del personal, disposiciones de desechos, manejo y mantenimiento de instalaciones; artículo 79 y 80: grupo de riesgo II con riesgo moderado para el individuo y limitado para la comunidad, laboratorio básico de microbiología.

10. METODOLOGÍA

10.1 Cultivo bacteriano y medio de cultivo

El cultivo empleado en la presente investigación fue la cepa de *E. faecalis* que fue donada por el Laboratorio de Microbiología perteneciente a la Maestría en Endodoncia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (U.A.S.L.P.). La pureza del cultivo fue verificado por la técnica de tinción de Gram. El medio empleado para el crecimiento del cultivo y los bioensayos fue el medio BHI.

10.2 Nanopartículas de plata

Se empleó una solución de Ag-NP (*Argovit*TM) concentradas al 20% con un contenido de plata metálica de 1.2% y un 18.8% de agente de cobertura de polivinilpirrolidona las cuales tienen una distribución de tamaño entre 3 y 50 nm, con una media de 35nm. Se almacenaron a 4°C protegiéndolas a exposición de luz envuelto en papel aluminio hasta su uso. Fueron proporcionadas por la Dra. Nina Bogdanchikova investigadora del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la Universidad Autónoma de México. Las nanopartículas son provenientes del laboratorio Vector-vita de Novosibirsk Rusia.

10.3 Preparación de los especímenes dentales

Para la experimentación se obtuvieron 60 dientes premolares de reciente extracción uniradiculares y uniconducto con desarrollo apical completo. Se excluyeron del presente estudio aquellos dientes que presentaban reabsorción. Los dientes extraídos se mantuvieron en solución de agua con glicerina líquida (1:1) hasta su manipulación, para evitar su deshidratación.

Se removieron las coronas usando un disco de diamante de alta velocidad con refrigeración (Komet, Brasseler, Lemgo, Alemania) obteniéndose especímenes de 15 mm. Se retiró con ultrasonido los restos de tejido periodontal de la superficie externa del diente.

Después de la decoronación se usaron limas tipo K # 10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) para verificar la permeabilidad de los conductos, se realizó

limpieza y conformación del conducto radicular ajustando a un diámetro de 0.35 a 0.5 mm de su longitud para estandarizar el diámetro interno utilizando limas *Wave One Gold* (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los especímenes se llevaron a baño ultrasónico (BRANSON 1510) con Hipoclorito de Sodio al 5,25% durante 10 minutos, posteriormente lavado con agua destilada y luego se llevaron a baño ultrasónico durante 10 min con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Branson 1510) para eliminar el barro dentinario. Se realizó un lavado final con agua destilada para eliminar residuos. Se selló la superficie radicular externa con 2 capas de barniz de uñas y se llevaron a autoclave para su esterilización a 15 lb durante 15 min.



Figura 5: Parte de la población de órganos dentales procesados para este estudio.

10.4 Cinética de crecimiento de *E. faecalis*.

Con la finalidad de conocer la duración de la fase logarítmica del cultivo bajo las condiciones ensayadas se realizó una cinética de crecimiento durante 24 horas. Para tal fin una colonia de *E. faecalis* crecida en agar, fue suspendida en 20 ml de caldo BHI (Fluka, Sigma) y cultivada a 37°C sin agitación por 24 horas; de este pre-inoculo se tomó una alícuota para inocular un matraz de 125 ml. Contenido 20 ml de medio BHI iniciando con una densidad óptica de 0.05 a 600 nm. El cultivo fue incubando durante 24 horas bajo las mismas condiciones tomando lecturas cada dos horas. De esta manera se conoció la duración de la fase logarítmica, fase en la cual se tomó el cultivo para los ensayos que se mencionan a continuación.

10.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de las Ag-Np en medio líquido.

La eficiencia de la actividad antimicrobiana de las Ag-NP fue examinada usando el método estándar de dilución en caldo. La CMI y CMB fue determinada en caldo BHI usando doce concentraciones de las NP-Ag de 50 a 1000 g/ml, con ajuste del cultivo de *E. faecalis* de 4 horas de crecimiento a 37°C sin agitación a una densidad de 0.1 a 600 nm, equivalente a una densidad poblacional de 1×10^8 UFC/mL utilizando el espectrofotómetro (HALO RB – 10 UV – VIS RATIO BEAM) ⁽¹⁰⁷⁾. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado incluyendo controles positivos que consistieron en caldo BHI sin Ag-NP más el cultivo bacteriano y controles negativos que fueron los medios a las distintas concentraciones sin inocular, todos los tubos fueron envueltos con papel aluminio para proteger a las Ag-NP de la luz e incubados durante 24 horas a 37 °C en obscuridad y sin agitación. Después de 24 horas las lecturas fueron tomadas de manera visual. Definiendo la CMI como la menor concentración del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento microbiano. La CMI fue anotada por turbiedad visual de los tubos antes y después de la incubación, y por su lectura en el espectrofotómetro a 600 nm para poder determinar el porcentaje de reducción bacteriana. Después de la determinación de la CMI alícuotas de 50 µL de los tubos donde no se observó crecimiento fueron sembradas en placas de agar nutritivo e incubadas a 37°C durante 48 horas para determinar si el efecto en la CMI fue bacteriostático o bactericida y de igual forma para conocer la concentración de la CMB la cual se define como la menor concentración del agente antimicrobiano que mata el 99.9 % de la población inicial bacteriana ⁽¹⁰⁸⁾.

10.6 Infección de los especímenes dentales

Para la infección de los especímenes dentales estos fueron colocados en tubos eppendorf estériles con 1 ml de caldo BHI con contenido bacteriano ajustada a una densidad poblacional de 0.1 a 600 nm (1×10^8 UFC/mL). Los tubos fueron cerrados y mantenidos a 37°C durante 21 días en incubadora (Luzeren modelo DHG9030A). Cada 24 horas 500 µL de BHI con crecimiento microbiano fue retirado y se agregó 500 µL de medio BHI fresco, con la finalidad de que formara una capa de células

sobre el conducto radicular debido a la proliferación de *E. faecalis* sobre el interior del diente. Completados los 21 días de incubación, los especímenes fueron lavados con suficiente agua destilada estéril y secados con puntas de papel estéril para ser empleados en la evaluación de la actividad antibacteriana del gel de Ag-NP intraconducto como se menciona más adelante.

10.7 Elaboración de gel de nanopartículas de plata

Para la elaboración del gel compuesto por Ag-NP y evaluar su actividad antimicrobiana en los dientes infectados con *E. faecalis* se realizó lo siguiente: en un vaso de precipitado previamente esterilizado se vertieron 10 ml de agua destilada estéril más 40 microgramos de carbómero hasta disolverlo completamente, posteriormente se introdujo 10 microlitros de trietanolamina para que el gel tomará su consistencia. Una vez hecho el gel se adiciono la cantidad necesaria de Ag-NP de un stock de 12 000 ug/ml para obtener dos concentraciones del gel de Ag-NP a 300 ug/ml y 500 ug/mL. El gel se homogenizo completamente para posteriormente ser envasado cada concentración en jeringas hipodérmicas cubiertas por papel aluminio para proteger de la luz a las Ag-NP contenidas en el gel. Una vez hecho esto los especímenes dentales fueron tratados con el gel de Ag-NP como se menciona a continuación.

10.8 Efecto de la actividad antibacteriana del gel de Ag-NP intraconducto

El procedimiento de medicación de los dientes se realizó aplicando los agentes gel de Ag-Np 300 ug/MI y gel de Ag-Np 500 ug/mL con jeringas y agujas capillary con lumen de 0.35 mm. (Ultradent Products, South Jordan, USA) hasta completar el lumen del canal.

Se incluyó como referencia hidróxido de calcio Ca(OH)_2 el producto comercial Ultracal XS® (Ultradent Products, South Jordan, USA); utilizado generalmente para este propósito (Gold standard) realizando el mismo procedimiento con el gel de Ag-NP. Para los ensayos los dientes se dividieron en cuatro grupos al azar donde cada grupo estaba conformado de 15 dientes como se menciona a continuación.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

Tabla 3. Grupos de estudio

| Grupo 1: Control sin medicación | Grupo 2: Ultracal XS® | Grupo 3: Gel de Ag-NP 300 ppm | Grupo 4: Gel de Ag-NP 500 ppm |
|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| N= 15 | N= 15 | N= 15 | N= 15 |

En la tabla 3 se presentan los grupos de estudio, una vez hechos los cuatro grupos estos fueron incubados a 37°C durante 7 días, tomando muestras de tres dientes (N=3) de cada grupo al tiempo 24 horas y siete días.

La torunda de teflón estéril, así como el Provisit (Casa Idea, México) fueron retirados del diente, se irriego con 10 ml de agua destilada estéril con aguja Endo-Eze® con la finalidad de retirar el medicamento intraconducto y posteriormente, con el propósito de recolectar muestras de los microorganismos adheridos a la dentina radicular se introdujo una lima tipo k #40 se realizó limado circunferencial a longitud de trabajo, posteriormente fueron adicionados 30 µL de 15 en 15 µL de agua destilada estéril dentro del conducto radicular para coleccionar las células desprendidas de *E. faecalis* de igual forma se introdujo la parte activa de la lima en un tubo eppendorf con 900 microlitros de agua destilada estéril el cual se agito 5 segundos en vortex para tener un factor de dilución de 66.66 en el tubo número 1, posteriormente se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-6} . De cada dilución se tomaron 15 microlitros los cuales fueron colocados sobre medio solido de Agar nutritivo por la técnica de goteo en placa e incubados a 37°C durante 48 horas o hasta la observación de crecimiento microbiano para de esta forma conocer el valor de UFC de cada espécimen, al tiempo cero, 24 horas y 7 días para cada tratamiento.

10.9 Metodología de prueba estadística

Los resultados fueron expresados como la media \pm la desviación estándar. Se analizaron por un análisis de varianza (ANOVA) con nivel de confianza de 95% para los datos de comparación de medias entre cada tratamiento y control se aplicó la prueba Tukey Kramer ($P= 0.05$). Los datos se analizaron con el paquete estadístico JMP versión 8 (SAS España).

11.RESULTADOS

11.1 Crecimiento y morfología de *E. faecalis*

En la figura 6 se puede observar *Enterococcus faecalis* con tinción de Gram observado con microscopía óptica 1000x. Se observan bacterias Gram positivas con forma cocobacilar u ovoide, que se presentan aisladas, en parejas o cadena corta.

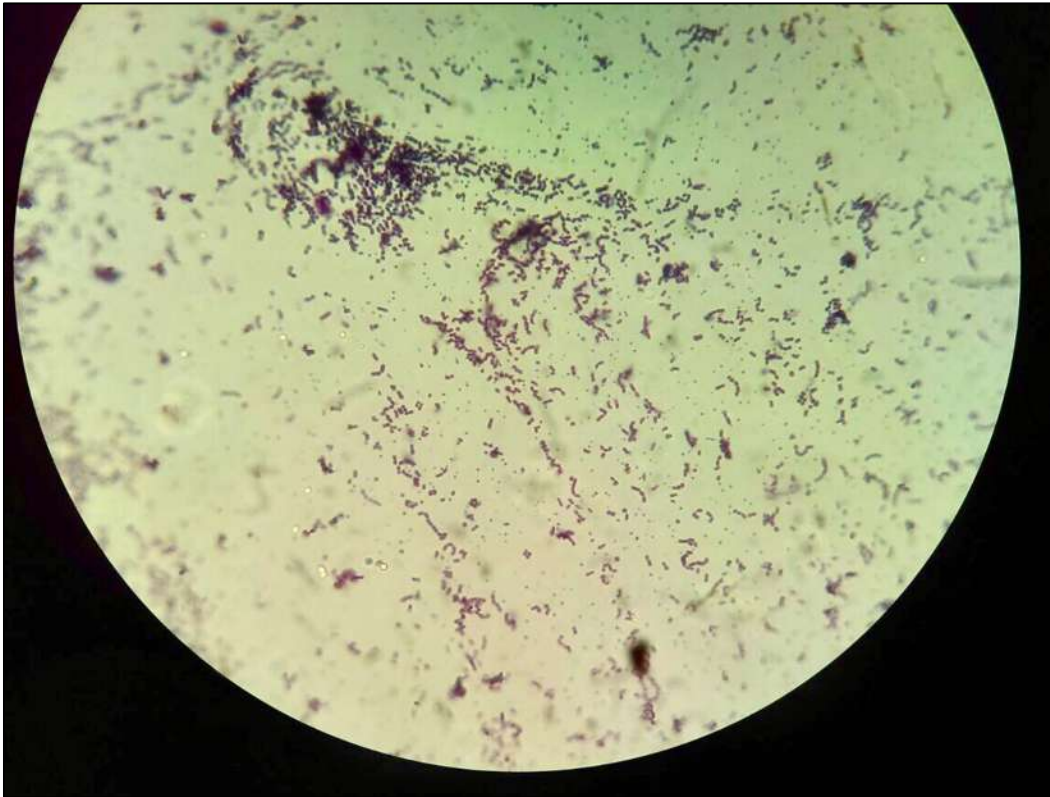


Figura 6. *Enterococcus faecalis*. Tinción de Gram se observa que son cocos Gram positivos.
Vistos en un microscopio objetivo 1000x.

11.2 Cinética de crecimiento de *E. faecalis*

En la cinética de crecimiento se diferencian cuatro fases, la fase de latencia, la fase logarítmica, la fase estacionaria y la fase de muerte celular. El conocimiento del ciclo de vida de la bacteria es importante para seleccionar la fase logarítmica donde se

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

aplica y evalúa la acción antibacteriana de las Ag-NP. En la figura 7 se observa la cinética de crecimiento:

- Fase de latencia 0-2 h.
- Fase logarítmica 4-6 h.
- Fase estacionaria a partir de las 6 h.

Durante 24 horas no se observó fase de muerte celular.

Se determinó la fase logarítmica la cual se presenta a partir de las 5 h posteriores al inicio de la cinética, con una densidad óptica igual a 1.183 como se puede observar en la figura 7.

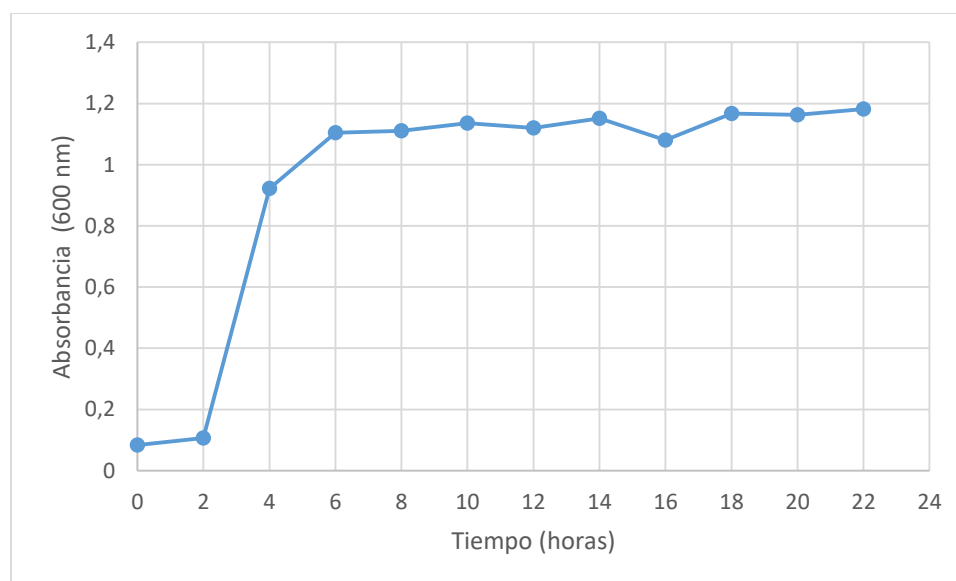


Figura 7: Densidad óptica de un cultivo de *E. faecalis* en caldo BHI (Fluka, Sigma) crecido a 37°C durante 24 horas.

11.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de las Ag-NP en medio líquido

Se determinó la CMI, que se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

después de 24 horas de incubación a 37°C. En la Figura 8 se representa el crecimiento de *E. faecalis* por densidad óptica con diferentes concentraciones (0, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm) de nanopartículas de plata en medio líquido BHI por triplicado.

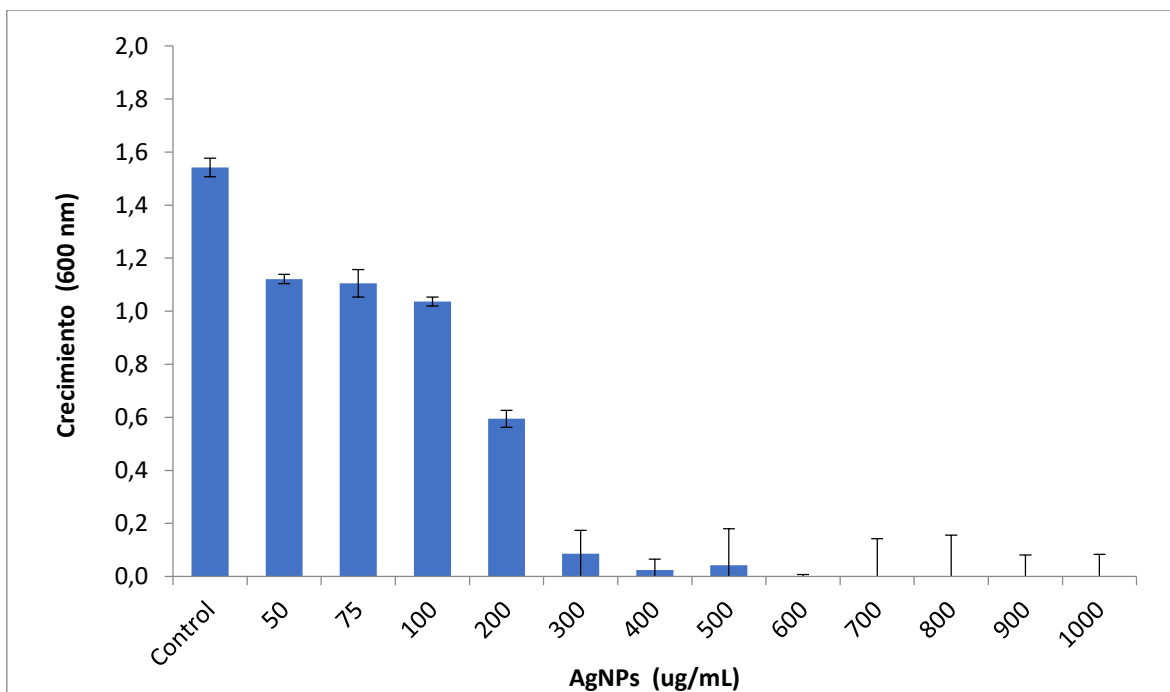


Figura 8: Promedio de absorbancias evaluado por densidad óptica y desviación estándar del efecto de diferentes concentraciones de Ag-NP sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis* a 37°C por 24 horas evaluado por densidad óptica según la concentración, con el control positivo.

En la Figura 9 se observa el crecimiento en porcentaje de *E. faecalis* con diferentes concentraciones (0, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm) de nanopartículas de plata en medio líquido BHI. A partir de la concentración de 300 ppm de nanopartículas de plata el crecimiento de *E. faecalis* disminuyó más del 90%, lo cual sugiere que esta podría ser la CMI para la bacteria.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

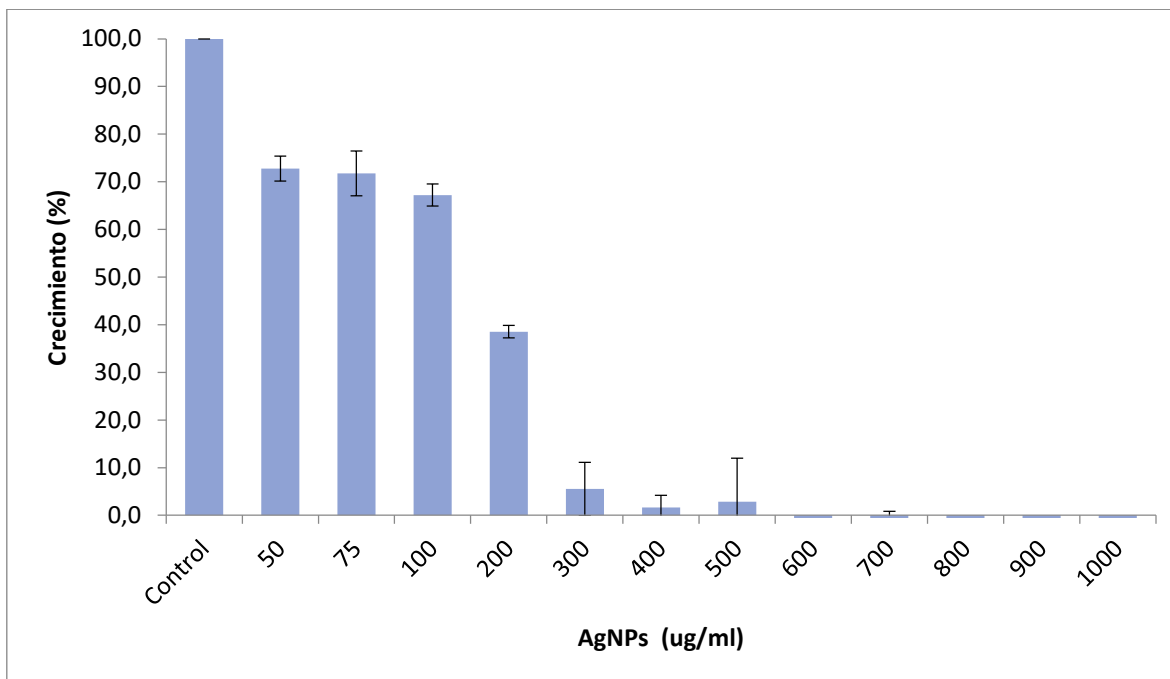


Figura 9: Porcentaje de crecimiento del efecto de la concentración de nanopartículas de plata sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis* a 37°C 24 h para CMI.

La concentración mínima bactericida la podemos definir como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina más del 99.9% de los microorganismos viables, se determinó inoculando de muestra a diferentes concentraciones mayores a 300 ppm en agar y se incubó a 37°C durante 24 horas para confirmar la ausencia de bacterias viables en caja Petri por triplicado.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

Tabla 4: Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB).

| DATOS DE CMI Y CMB | | |
|--------------------|-------------|-----------------|
| AgNPs (ug/mL) | Crecimiento | Efecto |
| Control | + | |
| 10 | + | |
| 25 | + | |
| 50 | + | |
| 75 | + | |
| 100 | + | |
| 200 | + | |
| 300 | - | Bacteriostático |
| 400 | - | Bacteriostático |
| 500 | - | Bacteriostático |
| 600 | - | Bacteriostático |
| 700 | - | Bacteriostático |
| 800 | - | Bacteriostático |
| 900 | - | Bactericida |
| 1000 | - | Bactericida |
| | | |
| CMI = 300 ug/mL | | |
| CMB= 900 ug/mL | | |

11.4 Infección de los especímenes dentales

Se realizó la formación de biofilm de *E. faecalis* en los conductos radiculares (Figura 10), la bacteria creció en tubos eppendorf, con medio BHI observándose mediante microscopio electrónico de barrido (SEM) la formación de biofilm en las paredes del conducto radicular a los 21 días.

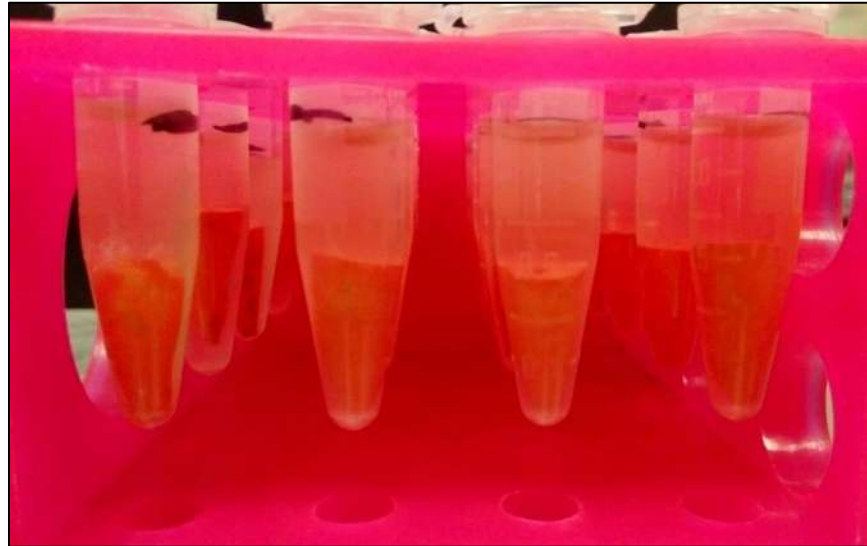


Figura 10: Órganos dentales sumergidos en 1 ml de caldo con cultivo de *Enterococcus faecalis*. Para la formación del biofilm se agregó 1 ml de caldo con suspensión bacteriana a cada tubo con espécimen en condiciones de esterilidad. Los tubos con los especímenes contaminados se cerraron y se mantuvieron a 37°C durante 21 días, reemplazando cada 24 horas 500 μ L de BHI saturado por 500 μ L de BHI fresco.

11.5 Análisis SEM/EDS de los especímenes

En la Figura 11, se presentan micrografías representativas del día 0 y día 21 de formación del biofilm *E. faecalis* a magnificación (2200x), en las que ya es posible detectarlo sobre la superficie de la pared radicular de los órganos dentales. En la figura 11A se examina la superficie de la pared del conducto radicular observando tubulillos dentinarios abiertos donde se aprecia la ausencia de bacterias. En la figura 11B se examina la superficie de la pared del conducto radicular en la cual se observa claramente una mayor cantidad de biofilm en relación al día 0.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

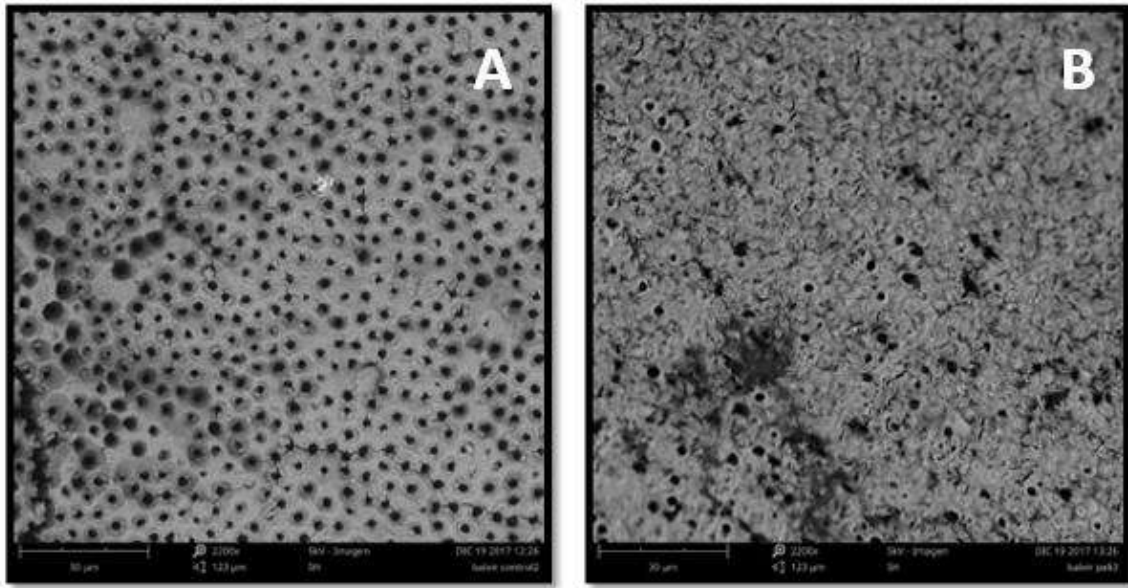


Figura 11: Imágenes SEM (2200x) antes y después de la formación de biofilm. A) Tubulillos dentinarios permeables sin microorganismos B) Biofilm de *E. Faecalis* formado sobre la superficie de la pared radicular.

En la figura 12, se presenta una micrografía con mayor resolución (10000x), en donde se observan registros de la morfología redondeada (cocácea) de *E. faecalis* sobre la superficie de la pared radicular.

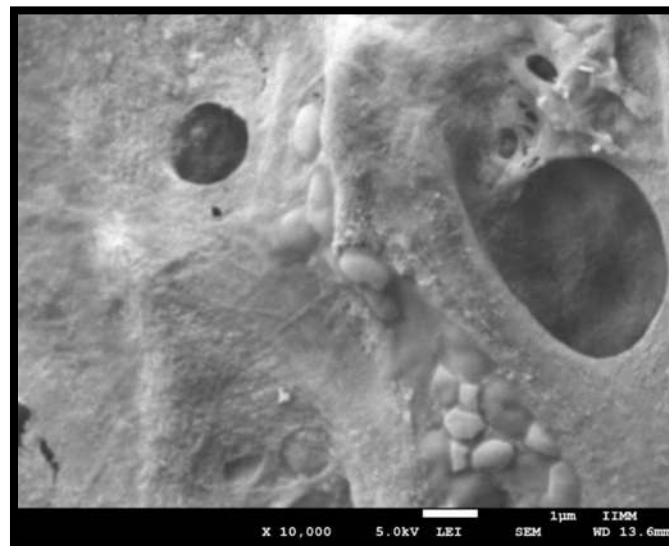


Figura 12: Micrografía en la cual se analiza la bacteria *E. faecalis* observando morfología cocácea sobre el tejido dentinario (10000x).

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

Las superficies observadas del grupo de Ag-NP por SEM también se analizaron simultáneamente mediante microanálisis EDS (del inglés Energy-dispersive X-ray spectroscopy) el cual proporcionó información cualitativa y cuantitativa de la composición analizando prácticamente todos los elementos existentes.

En la figura 13 se observa con puntos blancos la distribución de las nanopartículas de plata sobre la dentina radicular, indicando que las Ag-NP se adhieren y se distribuyen por toda la superficie del tejido dentario. El mapeo también revela los distintos componentes elementales de la dentina. Los elementos se presentan en la figura 14.

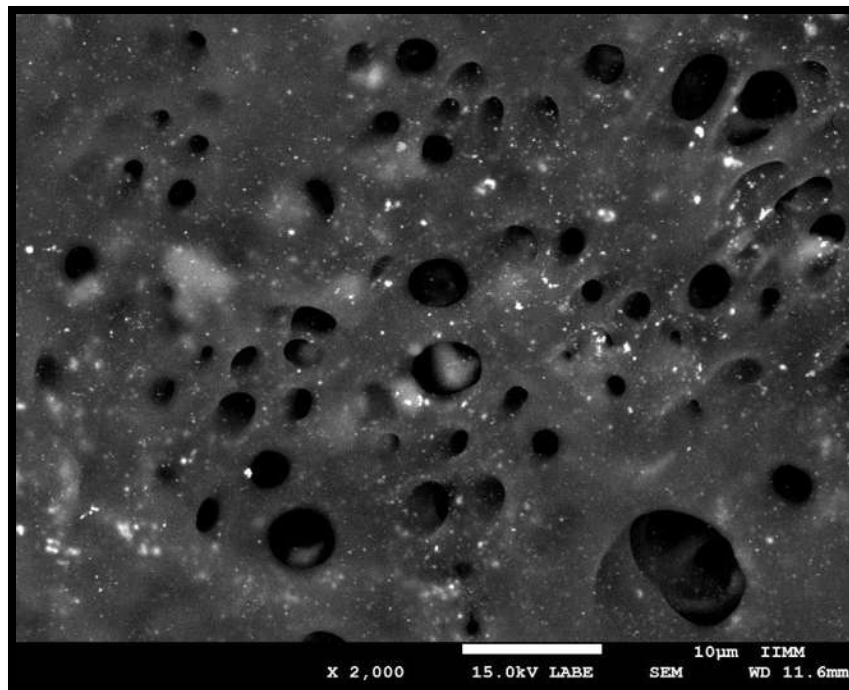


Figura 13: Mapeo EDS indicando con puntos blancos la distribución de las Ag-NP a 500 ppm sobre dentina radicular (2000x).

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

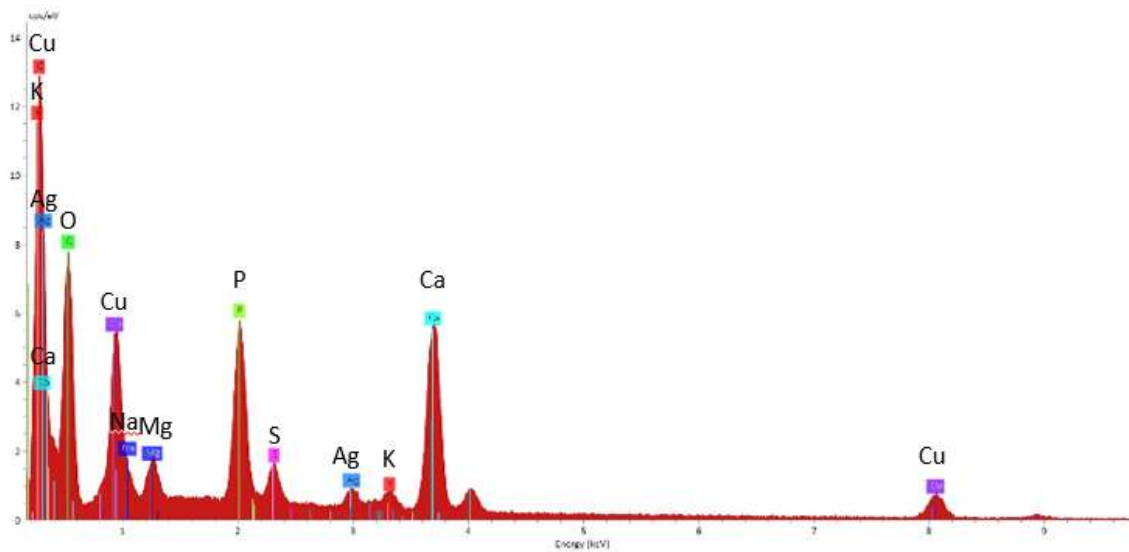


Figura 14: Espectro EDS que muestra la composición porcentual de los elementos presentes en la dentina y de plata de las Ag-NP, en espécimen medicado a 500 ppm.

De igual manera las superficies observadas por SEM de grupo de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ también se analizaron simultáneamente mediante microanálisis EDS. En la figura 15 se observa la pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sobre la dentina radicular, indicando que no tiene inserción dentro de los tubulillos dentinarios. El mapeo también revela los distintos componentes elementales, estos elementos se presentan en la figura 16.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

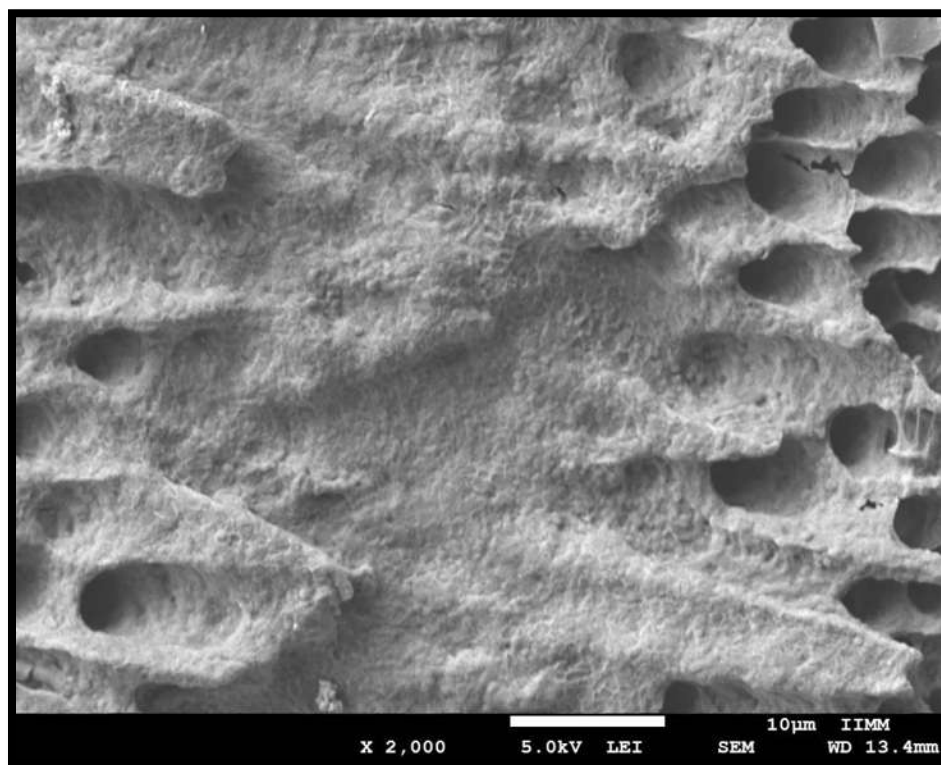


Figura 15: SEM indicando la distribución del Ca(OH)_2 sobre la dentina radicular (2000x)

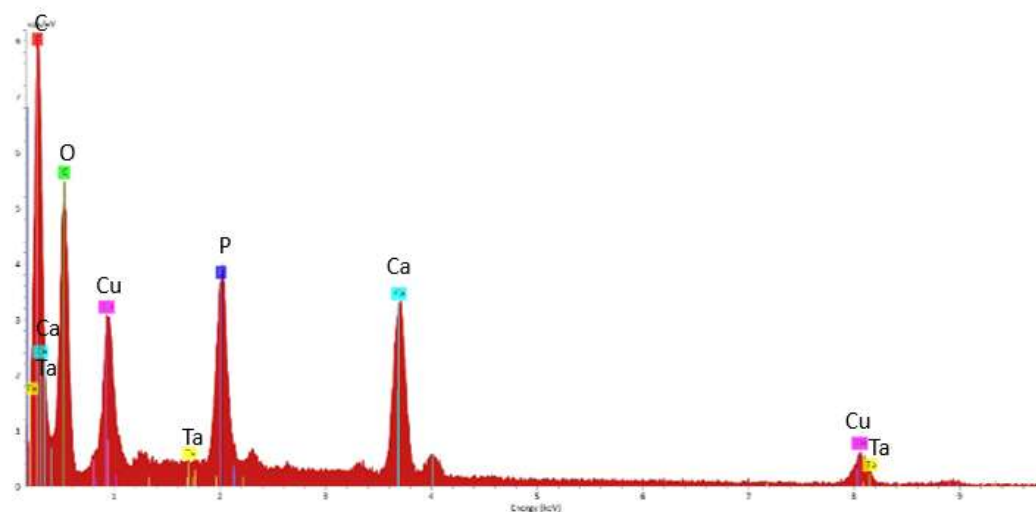


Figura 16: Espectro EDS que muestra la composición porcentual de los elementos presentes en la dentina y de Ca(OH)_2 , en espécimen medicado con Ultracal XS®.

11.6 Gel con Ag-NP

Una vez obtenidas las 2 concentraciones (300 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$) del gel compuesto por Ag-NP a base de carbómero y trietanolamina se envasaron en jeringas previamente esterilizados. Figura 17.



Figura 17: Preparación de gel de Ag-NP y envasado en jeringa.

11.7 Conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) de *E. faecalis* por grupo y por muestra

Se observaron y contaron UFC de *E. faecalis* en todas las muestras de los diferentes grupos (figura 18). En el grupo control, se observaron incontables UFC en todas las muestras. En los grupos de Ca(OH)_2 y gel de Ag-NP (300 y 500 ppm) se evidenció mínimo crecimiento en todas las muestras en los diferentes tiempos.

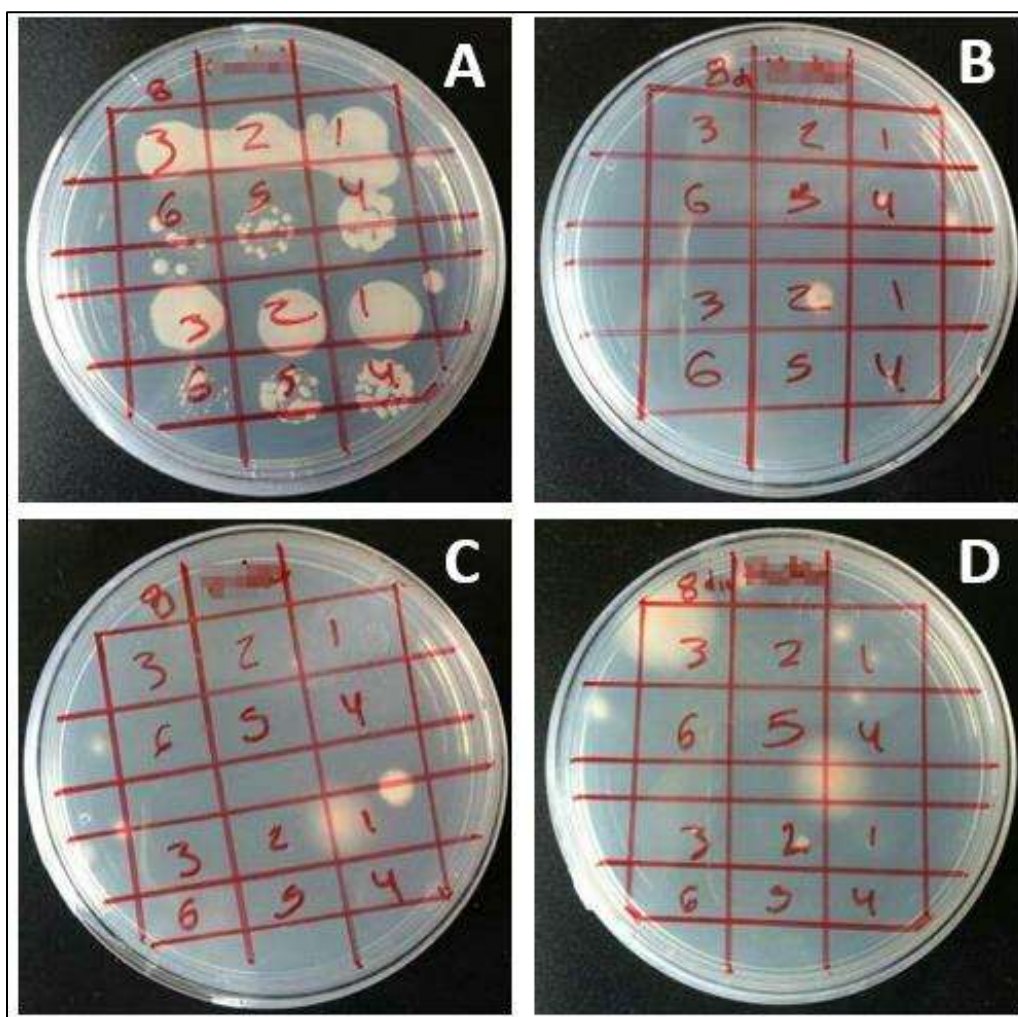


Figura 18: Conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) en caja Petri: A) Grupo Control, B) Grupo Ca(OH)₂, C) Grupo Ag-NP 300 ppm, D) Grupo Ag-NP 500 ppm.

11.8 Medición de la actividad antimicrobiana de la medicación

En la Figura 19 se presentan los valores de recuento de UFC, crecimiento y reducción de *E. faecalis* luego de la medicación intraconducto durante 1 y 7 días, respectivamente. Luego de 24 y 168 horas. de medicación los recuentos de Ultracal XS® y las diferentes concentraciones de Ag-NP fueron significativamente menores que los del control ($P < 0.05$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre Ag-NP y Ultracal XS® ($P < 0,05$), determinado mediante la prueba Tukey Kramer.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

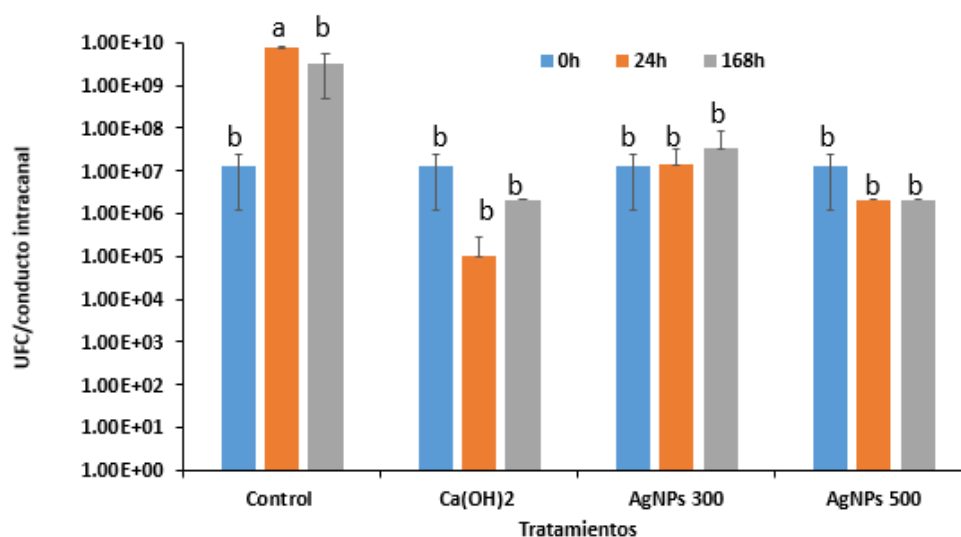


Figura 19: Recuento de UFC de *E. faecalis* intraconducto de los diferentes grupos de medicación y del grupo control a diferentes tiempos. (*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control.

En la tabla 5 y figura 20 se presentan los resultados del porcentaje de reducción microbiana de los diferentes grupos empleados a diferentes tiempos. Se observó un efecto antibacteriano sin diferencia estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones de Ag-NP en comparación con el Ca(OH)² a las 168 horas. Sin embargo, el efecto antibacteriano del grupo de las Ag-NP (300ppm) a las 24 horas fue menor que en los otros grupos. En todos los grupos existió diferencia del efecto antimicrobiano en comparación del grupo control.

Tabla 5: Porcentaje de reducción microbiano.

| Tiempo (h) | % Reducción | | | |
|------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|
| | Control | Ca(OH) ² | AgNPs 300 | AgNPs 500 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 99.99871788 | 99.82516556 | 99.97350993 |
| 168 | 0 | 99.93279194 | 98.89946794 | 99.93279194 |

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

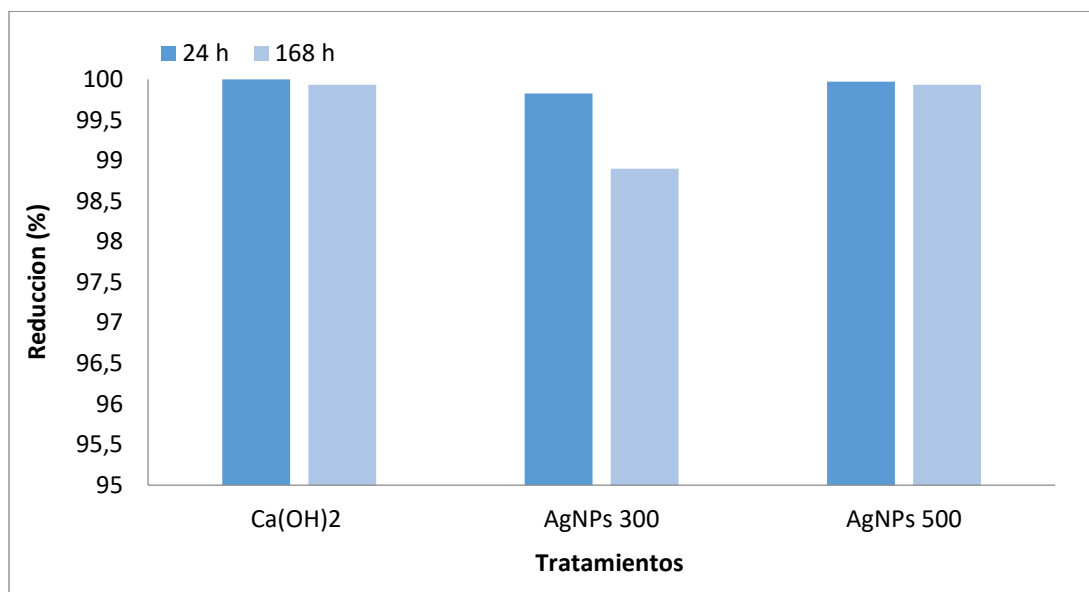


Figura 20: Reducción en porcentaje de *E. Faecalis* intraconducto de los diferentes grupos de medicación a diferentes tiempos. Luego de 7 días de medicación se mantuvo el efecto antimicrobiano tanto del gel de Ag-NP como de Ca(OH)².

12. DISCUSIÓN

Al analizar los primeros reportes clínicos del porcentaje de éxito en el tratamiento de endodoncia ^(110, 111, 112, 113, 114, 115, 116) y compararlos con reportes recientes ^(117, 118, 119) observamos que los resultados son semejantes. Esta situación es altamente desalentadora, ya que en los últimos 50 años se han desarrollado nuevas tecnologías con el propósito de innovar y progresar en diferentes áreas, pese a esto, en endodoncia se siguen empleando materiales en los cuales no se han desarrollado avances o mejoras ⁽¹²⁰⁾. El *E. faecalis* es uno de los microorganismos que habita en el tercio apical de conductos radiculares infectados, incluso existen estudios que señalan que es la bacteria predominante en casos de fracaso en el tratamiento de conductos ⁽¹²¹⁾. Durante décadas el hidróxido de calcio ha sido el medicamento intraconducto de primera elección, por su propiedad antibacteriana relacionada con la liberación de iones hidroxilo, que produce los efectos letales sobre las células bacterianas incluida la desnaturalización de proteínas y el daño a las membranas citoplásmicas bacterianas y ADN ⁽⁸³⁾. Sin embargo, esta actividad antimicrobiana puede ser inactivada por la dentina, el exudado del área periapical y el biofilm bacteriano ⁽¹²²⁾. Por otra parte, se tiene evidencia de la resistencia antimicrobiana del *E. faecalis* comprobándose que formo biopelículas en la presencia de diferentes presentaciones de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y que estas bacterias están envueltas en una matriz aún más densa ⁽¹²³⁾. También se informó que *E. faecalis* puede producir más matriz extracelular y proteína en respuesta a un pH alto o una dosis inhibitoria de antimicrobianos ⁽¹²⁴⁾. En cambio, las Ag-NP tienen la ventaja de disminuir la resistencia antimicrobiana ya que su mecanismo de acción tiene múltiples objetivos en la célula bacteriana ^(99, 100, 101).

Para realizar el presente estudio, se obtuvieron Ag-NP de la marca comercial “Argovit™”, se determinó su concentración mínima inhibitoria y bactericida, frente al *E. faecalis*; con estos datos se evaluó su actividad antimicrobiana en un modelo de medicación intraconducto *in vitro*. Para realizar una caracterización a la práctica clínica endodóntica, se evaluó la actividad antimicrobiana de las Ag-NP frente a un biofilm de *E. faecalis* formado sobre la superficie interna del conducto radicular *in*

vitro, manteniendo en fase de crecimiento la bacteria *E. faecalis* observando biofilm a los 21 días. Guerreiro-Tanomaru et al. ⁽¹²⁵⁾ reportan resultados similares utilizando diferentes sustratos como dentina y hueso bovinos, hidroxiapatita y gutapercha, y reportaron el desarrollo de biofilm a los 14 y 21 días, que observaron mediante el uso de métodos de tinción y microscopía confocal, encontrando el mayor desarrollo en hidroxiapatita. Por su parte, Bulacio et al. ⁽¹²⁶⁾ mediante el MEB confirmaron la formación de biofilm después de 14 días de incubación. Wu. et al ⁽¹⁰⁴⁾ formo con *E. faecalis* en dientes humanos durante 4 semanas un biofilm.

En nuestro estudio se corroboró la acción antimicrobiana de Ag-NP determinándose que las dos concentraciones estudiadas presentaron acción antimicrobiana pero solo a (500 ppm) fue equivalente a la de Ca(OH)² Ultracal XS® al primer y al séptimo día. La determinación de los valores de CMI (300ppm) utilizadas en la medicación se comprobó que las Ag-NP presentan actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*. Sin embargo, existe diferencia respecto al grupo de (500 ppm) debido a que al determinar la CMI la bacteria está en estado planctónico y en los órganos dentales extraídos se encontraba en biofilm.

Para nuestro estudio utilizamos las Ag-NP ya que es importante señalar que en investigaciones multidisciplinarias donde se relacionan aplicaciones biológicas que implican Ag-NP, a menudo hay diferencias por privación de información con respecto a sus propiedades fisicoquímicas. Esto debe incluir datos tales como las concentraciones de plata metálica, agente de cobertura, tamaño de nanopartículas, tiempo de exposición. Por lo tanto, una comparación directa entre diferentes resultados no es fácil, ya que la naturaleza de las preparaciones ensayadas normalmente difiere. En este sentido, nuestros resultados se refieren al contenido de plata metálica en la preparación de Argovit, mientras que otras investigaciones a menudo refieren sus resultados al peso de las nanopartículas como un todo, es decir, agente de cobertura y plata metálica, Tabla 6. Hasta este momento es la marca de nanopartículas que registro disminución de la actividad metabólica en líneas celulares cancerígenas con la concentración más baja comparado con otra Ag-NP de otras marcas ⁽¹²⁷⁾.

**EFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO***

Tabla 6: Comparación de diferentes estudios con gel de Ag-NP contra *E. Faecalis*

| Referencia | AgNPs (ppm) | Ag en AgNPs | Ag (wt%) | Agente de cobertura | Tamaño del diámetro o (nm) | Tiempo (días) | Laboratorio |
|-----------------------|----------------|----------------|-------------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------|---------------------------------|
| (Este estudio) | 300- 500 | - | 1.2 | 18.8 polivinilpir olidona | 15-35 | 1-7 | laboratorio Vector-vita |
| 104 | 20 | 350 ppm | - | - | 2 | 1-14 | (Huzheng® Nano Technology |
| 105 | 200 | 4.00 (wt%) | - | - | 70 | 1-30 | (NanoSany Corporation |
| 107 | 20 | 350 ppm | - | - | 2 | 1-7 | (Huzheng® Nano Technology |

Este estudio propone una medicación de nanopartículas de plata en un modelo a base de gel, ya que otra de las desventajas del hidróxido de calcio al utilizarlo como medicamento intraconducto son los remanentes que quedan unidos a las paredes del conducto radicular después de intentar removerlo (Figura 15). Se ha comprobado que estos remanentes del hidróxido de calcio interfieren con la capacidad de penetración en los tubulillos dentinarios de algunos selladores afectando la calidad de obturación y provocar filtración bacteriana posteriormente (128).

Debido al brote de las enfermedades infecciosas causado por diferentes bacterias patógenas y el desarrollo de resistencia a los antibióticos hay poca probabilidad de que los microorganismos desarrollen resistencia contra las Ag-NP debido a que interactúan con múltiples objetivos en la célula microbiana, como la membrana celular, enzimas y plásmidos, proporcionando al mismo tiempo a las bacterias menos capacidad para ganar resistencia ((99, 100, 101)). De igual manera comparando

con Ag-NP muchos productos de hidróxido de calcio tienen una actividad antifúngica limitada ^(129, 130).

Los organismos y sus productos, incluidas las endotoxinas, provocan reacciones inflamatorias graves en tejidos periapicales. La ubicación del biofilm dentro del sistema del conducto radicular del diente lo hace inaccesible para el sistema inmune del huésped, mientras que los túbulos proporcionan protección física a los medicamentos que se aplican tópicamente ⁽¹³¹⁾. Por otro lado, otra de las ventajas que ofrecen las Ag-NP por su tamaño es que se pueden trasladar en regiones del conducto radicular poco accesibles y penetrar en los túbulos dentinarios, mediante el uso de láser o agitación por el ultrasonido y con esto lograr una mayor eficacia frente a *E. faecalis* ⁽¹³²⁾.

Se han explorado diversas investigaciones tratando de potencializar el efecto antibacteriano de las Ag-Np en el conducto radicular combinándolas con hidróxido de calcio comercial en la cual se ha comprobado sus diferencias en cuanto a la efectividad antibacteriana frente a *E. faecalis*, esta interacción para modificar la actividad antimicrobiana puede mejorar (efecto sinérgico) y en ocasiones disminuir (efecto antagónico) ^(105, 107). De igual manera cuando se combina Ag-NP con antibióticos, Por lo tanto, dichas interacciones de Ag-NP con los otros agentes antimicrobianos deben optimizarse, de modo que la eficacia se mejore en lugar de deteriorarse ⁽¹²⁹⁾.

Comprobamos la efectividad de las Ag-NP (*Argovit*TM), en tamaño como en concentraciones pequeñas en contra del *E. faecalis*. Esto representa un punto a favor en cuanto a la toxicidad de estas partículas ya que se ha demostrado que causan daño mínimo alguno a estas concentraciones y cada día surgen más técnicas para su elaboración que las hacen menos dañinas al ser humano y al medio ambiente, no obstante, los problemas de toxicidad con NP requieren una mayor investigación. Ya que las investigaciones que señalan que las Ag-NP tienen baja toxicidad se basan en estudios de cultivo celular que usan líneas celulares. Por lo tanto, para un uso clínico se necesitan estudios en animales y humanos para evaluar el perfil toxicológico con mayor detalle.

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

13. CONCLUSIÓN

Al utilizar las nanopartículas (*Argovit™*) como medicación en un modelo intraconducto, se comprueba la hipótesis de trabajo demostrando una acción antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* que fue equivalente a la presentada por Ultracal XS®.

Debido a su tamaño las nanopartículas pueden llegar a profundizar a sitios donde se localizan las bacterias y otros medicamentos son incapaces de llegar.

Por otra parte, las nanopartículas de plata tienen una ventaja ya que es poco probable el desarrollo de resistencia microbiana debido a su mecanismo de acción y podrían ser una alternativa en aplicaciones en el campo endodóntico.

Estas nanopartículas podrían ser usadas para otorgarle propiedades antimicrobianas a materiales endodónticos, permitiendo ser utilizadas en las distintas etapas de la terapia.

14. PERSPECTIVAS

1. Publicación de un artículo JCR.
2. Estudiar la toxicidad del gel de Ag-NP en tejidos en cultivos celulares de tabaco en suspensión.
3. Investigar la incorporación de Ag-NP a conos de gutapercha Figura 21.



Figura 21: Actividad antimicrobiana de cono de gutapercha comercial y cono de gutapercha impregnado de Ag-NP sobre cepa de *Enterococcus faecalis* en medio sólido.

15.REFERENCIAS

1. Song M, Kim H, Lee W, Kim E. Analysis of the Cause of Failure in Nonsurgical Endodontic Treatment by Microscopic Inspection during Endodontic Microsurgery. *Journal of Endodontics*. 2011;37(11):1516-1519.
2. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1965;20(3):340-349.
3. Byström A, Sunqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal*. 1985;18(1):35-40.
4. Sjögren U, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1987;63(3):366-370.
5. Eleazer P, Glickman G, McClanahan S, Webb T, Jusman B. In: *Glossary of endodontic terms*. 8th ed. Chicago (IL): American Association of Endodontists; 2012. p.30.
6. Cvek M, Hollander L, Nord CE. Treatment Of Non-Vital Permanent Incisors With Calcium Hydroxide. VI. A Clinical, Microbiological And Radiological Evaluation Of Treatment In One Sitting Of Teeth With Mature Or Immature Root. *Odontologisk Revy*. 1976; 27: 93-108.
7. Foreman P, Barnes I. A review of calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*. 1990;23(6):283-297.
8. Kishen, Anil, and Annie Shrestha. "Nanoparticles for endodontic disinfection." *Nanotechnology in Endodontics*. Springer, Cham, 2015. 97-98.
9. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 2012;8: 37–45.
10. Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale research letters* 9.1 (2014): 373.

11. Abbaszadegan A, Ghahramani Y, Gholami A, Hemmateenejad B, Dorostkar B, Nabavizadeh M, Shargh H. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. *Journal of Nanomaterials* 16.1 (2015): 53
12. Ip M, Lui SL, Poon VKM, Lung I, Burd A. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol* 2006;55:59–63.
13. Friedman S, Mor C. The success of endodontic therapy: healing and functionality. *J Calif Dent Assoc* 2004;32:493–503.
14. Friedman S. Treatment outcome and prognosis of endodontic therapy. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, editors. *Essential endodontology*. Oxford: Blackwell Science Ltd; 1998. p. 367–401. Chapter 15.
15. Sjögren U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod*. 1990;16:498–504.
16. Ng Y-L, Mann S, Rahbaran J, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature – Part 2. Influence of clinical factors. *Int Endod J*. 2008;41:6–31.
17. Ng Y-L, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: Part 1: periapical health. *Int Endod J*. 2011;44:583–609.
18. Lin LM, Skribner J, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod*. 1992;18:625–7.
19. Ricucci D, Siqueira Jr JK. Biofilm and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*. 2010;36:1277–88.
20. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slot J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol*. 1987;3:86–90.
21. Sequra-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machca G, López-López J, Martín-González J, Velasco-Ortega E, Sánchez-Domínguez B, López-Frías FJ. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17:e356–61.

22. Bergenholtz G, Lekholm U, Milthon R, Heden G, Ödesjö B, Engström B. Retreatment of endodontic fillings. *Scand J Dent Res.* 1979;87:217–24.
23. Baumgartner JC, Falkler Jr WA. Bacteria in the apical 5 mm of the infected root canals. *J Endod.* 1991;17:380–3.
24. Chugal N, Clive JM, Spångberg LSW. Endodontic infection: some biologic and treatment factors associated with outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96:81–90.
25. Boucher Y, Matossian L, Rillard F, Machtou P. Radiographic evaluation of the prevalence and technical quality of root canal treatment in a French subpopulation. *Int Endod J.* 2002;35:229–38
26. Frisk F, Hugoson A, Hakeberg M. Technical quality of root fillings and periapical status in root filled teeth in Jonkoping, Sweden. *Int Endod J.* 2008;41:958–68.
27. Lin LM, Rosenberg PA, Lin J. Do procedural errors cause endodontic treatment failure? *J Am Dent Assoc.* 2005;136:187–93.
28. Tavares PB, Bonte E, Boukpepsi T, Siqueira Jr JF, Lasfargues JJ. Prevalence of apical periodontitis in root canal-treated teeth from an urban French population: influence of quality of root canal fillings and coronal restorations. *J Endod.* 2009;35:810–3.
29. Gillen BM, Looney SW, Gu L-S, Loushine BA, Weller RN, Loushine RJ, Pashley DH, Tay FR. Impact of the quality of coronal restoration versus the quality of root canal filling on success of root canal treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Endod.* 2011;37:895–902.
30. Sakamoto M, Siqueira Jr J, Rôças I, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiology and Immunology.* 2008;23(4):275-281.
31. Nair P, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2005;99(2):231-252.
32. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro Infection and of Dentinal Tubules. *Journal of Dental Research.* 1987;66(8):1375-1379.

33. Love R, Jenkinson H. Invasion of Dentinal Tubules by Oral Bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2002;13(2):171-183.
34. Marsh PD, Hunter JR, Bowden GH, Hamilton IR, McKee AS, Hardie JM, Ellwood DC. The influence of growth rate and nutrient limitation on the microbial composition and biochemical properties of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. *J Gen Microbiol*. 1983;129(3):755–70.
35. Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(1):54–85.
36. Chávez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod*. 2007;33(6):652–62.
37. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *Journal of conservative dentistry : JCD* 2010;13(4):233-239.
38. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:281-93.
39. Siqueira JF Jr. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. *Endod Topics* 2005; 10:123–47.
40. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Molecular detection and identification of *Synergistes* phylotypes in primary endodontic infections. *Oral Dis*. 2007;13(4):398-401.
41. Rôças IN, Siqueira JF. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3599-606.
42. Saeed M, Koller G, Niazi S, Patel S, Mannocci F, Bruce K et al. Bacterial Contamination of Endodontic Materials before and after Clinical Storage. *Journal of Endodontics*. 2017;43(11):1852-1856.
43. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001;34(6):429-34
44. Mejare B. *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* in infected dental root canals at filling and their susceptibility to azidocillin and some comparable antibiotics. *Odontologisk revy*, 1975; 26(3), 193-204.
45. Centikaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4): 686-707.

46. Mchugh C, Zhang P, Michalek S, Eleazer P. pH Required to Kill *Enterococcus faecalis* in Vitro. *Journal of Endodontics*. 2004;30(4):218-219.
47. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol* 2005; 50(6): 575-583.
48. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. *Journal of endodontics* 41.8 (2015): 1207-1213.
49. Costerton JW, Cheng K-J, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, et al. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435–64.
50. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. 1994. Minireview: biofilms, the customized micronich. *J. Bacteriol.* 176(8):2137–42.
51. Costerton JW: Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* 2001, 9:50-52.
52. He X, Ahn J. Differential gene expression in planktonic and biofilm cells of multiple antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2011;325:180–8.
53. Okada M, Sato L, Cho S, Iwata H, Nishio T, Dubnau D, Sakagami Y. Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nat Chem Biol.* 2005; 1: 23-24.
54. Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics.* 2004;9(1):27-36.
55. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001;358(9276):135–8.
56. Macia M, Rojo-Molinero E, Oliver A. "Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria." *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20(10): 981-990

57. Naves P, Del Prado G, Huelves L, Rodríguez-Cerrato V, Ruiz V, Ponte MC, Soriano F. Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-L-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. *J Hospital Infect.* 2010; 76: 165-170.
58. Nealson KH, Hastings JW. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43:496–518
59. Ng W, Bassler B. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics.* 2009;43(1):197-222.
60. Nowak M, Kurnatowski P. [Biofilm caused by fungus structure, quorum sensing, morphogenetic changes, resistance to drugs]. *Wiad Parazytol.* 2009;55(1):19-25.
61. Abou-Rass M, Frank AL, Glick DH. The anticurvature filing method to prepare the curved root canal. *J Am Dent Assoc.* 1980;101(5):792-4.
62. Hülsmann M, Peters OA, Dummer PMH. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endod Topics* 2005;10:30 –76.
63. Peters O, Schonenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *International Endodontic Journal.* 2001;34(3):221-230.
64. Berutti E, Marine R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod* 1997;23:725–7.
65. Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 560-569.
66. Fouad A. Endodontic Microbiology and Pathobiology. *Dental Clinics of North America.* 2017;61(1): 287-311.
67. Kanisavaran ZM. Chlorhexidine gluconate in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008;58:247-57
68. Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci.* 2014;22:356-65.

69. Grant PB, Walsh LJ. Problems and adverse effects associated with the use of chlorhexidine in dental practice. *Periodont.* 1985;6:33-8.
70. Calderón B, Loeza M, Ruiz H, Morán G, Gómez M, Rodríguez G. Análisis fisicoquímico de la interacción. *Revista endodoncia actual.* 2013; 8:30-35.
71. Radcliffe C, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker D. 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;37:438-46.
72. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentine biofilms in vitro. *J Endod.* 2006;32:434-7.
73. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod.* 2004;30:785-7.
74. Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation – literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000;33:186-93.
75. Fager FK, Messer HH. Systemic distribution of champhorated monochlorophenol from cotton pellets sealed in pulp chambers. *J Endod* 1986;12:225-230.
76. Masillamoni CRM, Kettering JD, Torabinejad M. The biocompatibility of some root canal medicaments and irrigants. *Int Endod J* 1981;14:115-20
77. Block RM, Lewis RL, Hirsch J, Coffey J, Langeland K. Systemic distribution of N2 paste containing 14C paraformaldehyde following root canal therapy in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 50: 350 - 360.
78. Vijayaraghavan R, Mathian VM, Sundaram AM, Karunakaran R, Vinodh S. Triple antibiotic paste in root canal therapy. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences.* 2012;4(Suppl 2):S230-S233.
79. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J.* 2007;52(Suppl): S64-82
80. Fava LR, Saunders WP. "Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications." *International endodontic journal* 1999; 32.4: 257-282.

81. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2011;44:697-730.
82. Siqueira J, Lopes H. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide. *Int Endod J*, 1999; 32: 361-69.
83. Van Der Waal SV, De Soet JJ, Wesselink PR, Crielaard W. Calcium Hydroxide Treatment Does Not Alter the Susceptibility of *Enterococcus faecalis* Biofilms to Sodium Hypochlorite. *European Endodontic Journal* 2017; 2.1: 30.
84. Kishen A. *Nanotechnology in Endodontics: Current and Potential Clinical Applications*, 1st ed. Switzerland: Springer; 2015.
85. Acharya S, Sahoo SK. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63: 170-83.
86. Ocheke Nelson A, Olorunfemi Patrick O, Nanotechnology and drug delivery part 1: background and applications. *J Pharm Res*. 2009;8: 265–274.
87. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 2007;3:20–31
88. Meyer DE, Curran MA, Gonzalez MA. An examination of existing data for the industrial manufacture and use of nanocomponents and their role in the life cycle impact of nanoproducts. *Environ. Sci. Technol.* 2009; 43(5): 1256–1263.
89. Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012; 14.9: 1109–1120.
90. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Heal Perspect* 2005;113(7): 823–939.
91. Chen X, Schluesener H. Nanosilver: a nanoparticle in medical application." *Toxicology letters* 2008; 176.1: 1-12.
92. Egusquiaguirre SP, Igartua M, Hernandez RM, Pedrez JL. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Clinical and Translational Oncology* 2012; 14.2 : 83-93.

93. Saji G. Nanomaterial Properties: Implications for Safe Medical Applications of Nanotechnology." *Nanotechnology in Endodontics*. Springer, Cham, 2015. 45-69.
94. Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M. "Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles." *Nanotoxicology* 2014; 8.3: 233-278.
95. Samiei M, Farjami A, Dizaj SM, Lotfipour F. Nanoparticles for antimicrobial purposes in Endodontics: A systematic review of in vitro studies. *Materials Science and Engineering*: 2016; 58: 1269-1278.
96. Ferré, Emily Claire. "The Many Uses of Silver." (2017).
97. Alexander J. History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections*. 2009;10(3):289-292.
98. Tokumaru T, Shimizu Y, Fox C L. "Antiviral activities of silver sulfadiazine in ocular infection." *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 1974; 8.1: 151.
99. Le Ouay B, Stellacci F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: a surface science insight. *Nano Today* 2015; 10.3: 339-354.
100. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents, *Molecules*. 2015; 20 8856–8874.
101. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition* 2013; 52.6: 1636-1653.
102. Gleiter H. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta materialia* 2000; 48.1: 1-29.
103. Ghiciuc CM, Ghiciuc ON, Ochiuz L, Lupuşoru CE. Antibacterial effects of metal oxides-containing nanomaterials in dentistry. *E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*, 2017. IEEE, 2017.
104. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann J, Fan B. Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal of Endodontics*. 2014;40(2):285-290.

105. Javidi M, Afkhami F, Zarei M, Ghazvini K, Rajabi O. Efficacy of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide root canal medication on elimination of *Enterococcus faecalis*. *Australian Endodontic Journal*. 2013;40(2):61-65.
106. Afkhami F, Pourhashemi S, Sadegh M, Salehi Y, Fard M. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dentistry*. 2015;43(12):1573-1579.
107. Saad A, Alabdulmohsen Z. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. *Saudi Endodontic Journal*. 2017;7(1):29.
108. Li W, Xie X, Shi Q, Zeng H, OU-Yang Y, Chen Y. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;85(4):1115-1122.
109. Krishnan R, Arumugam V, Vasaviah SK. The MIC and MBC of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* – a facultative anaerobe. *J Nanomed Nanotechnol*. 2015;6:285–288.
110. Strindberg LZ. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors. An analytic study based on radiographic and clinical follow-up examination. *Acta Odontol Scand*. 1956;14:21.
111. Grahne´n H, Hansson L. The prognosis of pulp and root canal therapy. *Odontol Revy* 1961; 12: 146–165.
112. Seltzer S, Bender IB, Turkenkopf S. Factors affecting successful repair after root canal therapy. *J Am Dent Assoc*. 1963;52:651–62.
113. Zeldow B J, Ingle JI. Correlation of the positive culture to prognosis of endodontically treated teeth: clinical study. *J Am Dent Assoc* 1963;66:23-7.
114. Bender I, Seltzer S. To culture or not to culture? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1964; 18: 527–540
115. Grossman LI, Shepard LI, Pearson LA. Roentgenologic and clinical evaluation of endodontically treated teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1964;17:368–74.
116. Engström B, Lundberg M. The correlation between positive culture and the prognosis of root canal therapy after pulpectomy. *Odontol Revy*. 1965;16:193–203.

117. De Chevigny C, Dao TT, Basrani BR, Marquis V, Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S. Treatment outcome in endodontics: the Toronto study – phase 4: initial treatment. *J Endod.* 2008;34:258–63.
118. Ng Y-L, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J.* 2011;44:583–609.
119. Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spangberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112:825–42.
120. Belizzi R, Cruse WP. A historic review of endodontics, 1689-1963. *J Endod* 1980;6:576-608.
121. Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *Journal of Endodontics.* 2006;32(2):93-98.
122. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TMT, Orstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000;33:126 –31.
123. Distel J, Hatton J, Gillespie M. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *Journal of Endodontics.* 2002;28(10):689-693.
124. Wilson CE, Cathro PC, Rogers AH, Briggs N, Zilm PS. Clonal diversity in biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in response to environmental stress associated with endodontic irrigants and medicaments. *Int Endod J* 2015; 48(3): 210-19.
125. Guerreiro-Tanomaru J, de Faria-Júnior N, Duarte M, Ordinola-Zapata R, Graeff M, Tanomaru-Filho M. Comparative Analysis of *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation on Different Substrates. *Journal of Endodontics.* 2013;39(3):346-350.
126. Bulacio María de los Á, Galván Lucas R, Gaudioso Cristina, Cangemi Rosa, Erimbaue Marta I. *Enterococcus faecalis* biofilm: Formation and development in vitro observed by scanning electron microscopy. *Acta odontol. latinoam.* 2015; 28(3): 210-214.

127. Juárez-Moreno K, Gonzalez E, Girón-Vazquez N, Chávez-Santoscoy R, Mota-Morales J, Perez-Mozqueda L et al. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human & Experimental Toxicology*. 2016;36(9):931-948.
128. Ma J, Shen Y, Yang Y, et al. In vitro study of calcium hydroxide removal from mandibular molar root canals. *J Endod* 2015;41:553–8.
129. Vazquez-Muñoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e108876.
130. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod*. 2002;28:68-71.
131. Zhang FH, Li M, Wei ZJ, Zhao B. The effect of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide medication on the biofilm of *Enterococcus faecalis* in starvation phase. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2016;25:11–5.
132. Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Ferreira DC, Curvelo JA, Soares RM, Rosado AS. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. *J Endod*. 2012;38:1202-6.

16.ANEXOS



Red Internacional de Bionanotecnología con Impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad

CARTA DE COMPROMISO DE CONFIDENCIALIDAD

PRIMERA: Mantendré bajo reserva y no podré propagar, difundir o usar en beneficio propio o de terceros la totalidad o parte de cualquier dato o información considerada por la Red Internacional de Bionanotecnología (RIB) como “información confidencial”.

SEGUNDA: Así mismo, la RIB desea mantener en secreto sus bases de datos e informaciones propias de su trabajo, tales como métodos, Know how, resultados, análisis de laboratorio, proyectos, actividades, proveedores, negocios, contratos, asuntos de interés privado y otras actividades inherentes a sus actividades, de desarrollo e innovación, o comercial.

TERCERA: No podré apropiarme, revelar o utilizar el contenido del secreto de la RIB descrito para él, para mi beneficio directo o indirecto o de terceros, excepto de la RIB misma, salvo autorización previa y por escrito de la RIB.

CUARTA: Este acuerdo tendrá un término de vigencia exactamente igual a mi permanencia como miembro de la RIB, más 5 años contados a partir de la fecha en la cual el presente acuerdo haya expirado, a menos que la RIB acuerde por escrito otra cosa conmigo. Adicionalmente, debo solicitar autorización de la RIB para hacer uso de la información para cualquier fin, una vez termine el tiempo total estipulado de duración del presente acuerdo.

QUINTA: Toda la propiedad intelectual que se genere con información de la RIB, tales como artículos, resúmenes, tesis, trabajos deberán contar con un integrante

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN UN SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES *IN VITRO*

de la red y un experto en nanomateriales del grupo de la RIB, para poder hacer públicas dichas actividades..

En constancia de lo anterior, se firma, en la ciudad de Ensenada, B.C., a los 10 días del mes de octubre del año dos mil diecisiete.

Responsable RIB

Dra. Nina Bogdanchikova

Miembro RIB