

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MEZCLAS  
DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS  
COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO**

**TRABAJO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

**PRESENTA**

**C.D. AMAIRANI DENISSE SÁNCHEZ GONZÁLEZ**

**PRESIDENTE**

**(DIRECTORA DEL PROYECTO)**

**DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ**

**SINODAL**

**(CO-DIRECTOR DEL PROYECTO)**

**DR. MANUEL ALATORRE MEDA**

**SINODAL**

**(CO-DIRECTORA DEL PROYECTO)**

**DRA. ANA GABRIELA CARRILLO  
VÁRGUEZ**

**SINODAL**

**(CO-DIRECTOR DEL PROYECTO)**

**DR. LEONARDO DANIEL ACOSTA TORRES VERY**

**TIJUANA, BAJA CALIFORNIA; MÉXICO**

**JUNIO 2024**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA  
EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO**

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas  
afromexicanas"

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

**AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO.**

Propuesto por la **C.D. AMAIRANI DENISSE SÁNCHEZ GONZÁLEZ**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE  
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"**



**DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ**  
PRESIDENTE

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas  
afromexicanas"

**FACULTAD DE ODONTOLÓGIA TIJUANA  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

**AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO.**

Propuesto por la **C.D. AMAIRANI DENISSE SÁNCHEZ GONZÁLEZ**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE  
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"**

  
**DR. MANUEL ALATORRE MEDA**  
SINODAL

**"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas  
afromexicanas"**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

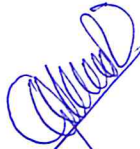
**AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO.**

Propuesto por la **C.D. AMAIRANI DENISSE SÁNCHEZ GONZÁLEZ**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE  
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"**



**DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ**  
SINODAL

**"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas  
afromexicanas"  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

**AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO.**

Propuesto por la **C.D. AMAIRANI DENISSE SÁNCHEZ GONZÁLEZ**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE  
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"**

  
**DR. LEONARDO DANIEL ACOSTA TORRES VERY**  
SINODAL

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA  
EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO**

**PRESENTA**



C.D. AMAIRANI DENISSE SÁNCHEZ GONZÁLEZ

**PRESIDENTE**

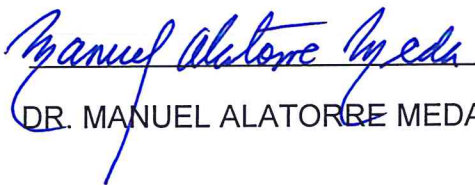
**(DIRECTORA DEL PROYECTO)**



DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ

**SINODALES**


**(CO-DIRECTORES DEL PROYECTO)**



DR. MANUEL ALATORRE MEDA



DRA. ANA GABRIELA CARRILLO  
VÁRGUEZ



DR. LEONARDO DANIEL ACOSTA TORRES VERY

Tijuana, Baja California, 7 de junio de 2024

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a mi familia, sobre todo a mis padres que amo y son el pilar de mi vida, gracias por su apoyo incondicional, por motivarme a seguir adelante, por todas sus enseñanzas a lo largo del camino y por impulsarme a ser mejor persona y profesionalista cada día; también quiero agradecer a mi amiga de toda la vida, mi hermana, que siempre ha estado para mí, me apoya día a día y festeja conmigo cada meta alcanzada.

A Gabriel, que ha sido una fuente de apoyo indispensable, gracias por ser quién eres, por tanto amor y por ser luz en mis días.

Agradezco a la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez, Coordinadora del Posgrado y Co-directora del proyecto, por sus enseñanzas, por su dedicación y por permitirme formar parte de una generación más del posgrado.

De igual manera, agradezco de manera muy especial a la directora de este proyecto la Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez, quien ha sido un pilar durante todo este camino, gracias por creer en mí desde licenciatura, por brindarme palabras de aliento cuando las necesité, por sus enseñanzas y por haberme guiado con dedicación para la realización del proyecto, gracias por su apoyo incondicional a lo largo del camino. Toda mi admiración y aprecio por usted.

A mi Co-director, el Dr. Manuel Alatorre Meda por compartir sus valiosos conocimientos, por su contante apoyo y por formar parte de este logro. También gracias a mi Co-director, el Dr. Leonardo Daniel Acosta Torres Very, por su contribución al proyecto y por formar parte de este equipo.

Por último, quiero agradecer a los docentes, amigos y a todas las personas que han contribuido a mi camino con cariño, respeto y apoyo.

### **Agradecimientos institucionales**

Quiero agradecer a las siguientes instituciones:

Inicialmente, agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California y al Posgrado en Endodoncia por haberme aceptado para ser parte de ella y permitirme formarme como especialista en Endodoncia.

Al Laboratorio de Evaluación Microbiológica de Biomateriales de la Facultad de Odontología-Tijuana, UABC; por permitirnos realizar la experimentación en sus instalaciones. Responsable: Dr. Leonardo Daniel Acosta Torres Very.

Al Laboratorio Zapata, por la donación de la cepa *Enterococcus faecalis*.

A CONACyT por la beca otorgada, No. CVU: 1226564.

**CONTENIDO**

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE ECUACIONES</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>I. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
2.1. ENDODONCIA .....	2
2.2. TIPOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS.....	2
2.2.1. Infección primaria .....	3
2.2.2. Infección secundaria .....	4
2.2.3. Infección persistente .....	5
2.3. BIOPELÍCULA .....	5
2.3.1. Enterococcus faecalis .....	7
2.4. MEDICACIÓN INTRACONDUCTO.....	9
2.4.1. Características de un medicamento intraconducto ideal .....	9
2.5. HIDRÓXIDO DE CALCIO .....	10
2.5.1. Características químicas .....	10
2.5.2. Mecanismos de actividad antibacteriana.....	11
2.5.3. Preparación de pasta de hidróxido de calcio como medicación intracondcto.....	12
2.5.4. Limitaciones del hidróxido de calcio .....	15

2.6. MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO CON N-ACETILCISTEÍNA COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO .....	16
2.6.1. N-acetilcisteína.....	16
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>18</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	20
5.2. HIPÓTESIS NULA (H0) .....	20
5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1) .....	20
<b>VI. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>VII. VARIABLES .....</b>	<b>22</b>
7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES .....	22
7.2. VARIABLES DEPENDIENTES .....	22
7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES .....	22
<b>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
8.1. TIPO DE ESTUDIO.....	23
8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO .....	23
8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL.....	25
8.4. METODOLOGÍA .....	26
8.4.1. Preparación de las muestras.....	26
8.4.2. Preparación del caldo de cultivo BHI.....	27
8.4.3. Preparación de la suspensión madre de <i>E. faecalis</i> .....	28
8.4.4. Ensayo de difusión en agar.....	30

8.4.5. Ensayo de difusión en caldo .....	31
8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
<b>IX. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
9.1. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR A 24 Y 48 h .....	35
9.2. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN CALDO A 24 h .....	39
<b>X. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>XI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
<b>XII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de necrosis pulpar a partir de una lesión cariosa .....	4
Figura 2. Biopelícula bacteriana .....	6
Figura 3. Conducto radicular llenado con $\text{Ca(OH)}_2$ .....	14
Figura 4. Preparación de las muestras.....	27
Figura 5. Preparación del medio de cultivo y esterilización .....	28
Figura 6. Preparación de la solución madre de bacterias .....	29
Figura 7. Ensayo de difusión en agar.....	30
Figura 8. Control y registros .....	31
Figura 9. Colocación de discos y solución madre .....	33
Figura 10. Caracterización a través de espectroscopia de UV .....	34
Figura 11. Ensayo de difusión en agar después de su incubación a las 24 y 48 h. .....	36
Figura 12. Halo de inhibición bacteriana tras la incubación de las muestras en contacto con las bacterias por 24 y 48 h. ....	37
Figura 13. Fotografía representativa de los Sistemas y Controles objeto de estudio después de 24 h de incubación con la bacteria <i>E. faecalis</i> .....	39
Figura 14. Porcentaje de bacterias <i>E. faecalis</i> encontradas en el caldo de cultivo tras su incubación en presencia de $\text{Ca(OH)}_2$ , NAC, Agua estéril, Gentamicina, Ampicilina y mezclas de $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC a diferentes proporciones por 24 h.....	40

**ÍNDICE DE ECUACIONES**

Ecuación 1. Bacterias en caldo (%).....32

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><i>A. israelii</i></b>	<i>Actinomyces israelii</i>
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
<b><i>A. odontolyticus</i></b>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
<b>BHI</b>	Infusión Corazón Cerebro (por sus siglas en inglés)
<b>CBM</b>	Concentración bactericida mínima
<b>CIM</b>	Concentración inhibitoria mínima
<b><i>C. rectus</i></b>	<i>Campylobacter rectus</i>
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b>	Hidróxido de calcio
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>E. faecalis</i></b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etildiaminotetracético
<b><i>F. nucleatum</i></b>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<b><i>K. pneumoniae</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b><i>L. acidophilus</i></b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<b><i>L. paracasei</i></b>	<i>Lactobacillus paracasei</i>

<b>μl</b>	<i>Microlitros</i>
<b>ml</b>	Mililitros
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>nm</b>	Nanómetros
<b><i>P. acnes</i></b>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b><i>P. endodontalis</i></b>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>
<b>pH</b>	Potencial hidrógeno
<b><i>P. propionicum</i></b>	<i>Propionibacterium propionicum</i>
<b><i>P. nigrescens</i></b>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<b><i>S. anginosus</i></b>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S. epidermidis</i></b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b><i>S. gordonii</i></b>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<b><i>S. mitis</i></b>	<i>Streptococcus mitis</i>
<b><i>S. oralis</i></b>	<i>Streptococcus oralis</i>
<b><i>S. sanguinis</i></b>	<i>Streptococcus sanguinis</i>

*LISTA DE ABREVIATURAS*

**TSA**                      *Agar de Soya Trypticaseína* (por sus siglas en inglés)

**SPEs**                     Sustancias poliméricas extracelulares

## I. RESUMEN

**Introducción:** El tratamiento de conductos requiere del uso adecuado de medicación intraconducto que reduzca o elimine de manera efectiva las bacterias. Actualmente, el hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) es considerado el medicamento intraconducto más favorable, siendo una de sus principales fortalezas su actividad antibacteriana. Sin embargo, se ve limitada su acción contra microorganismos que forman biopelícula debido a que su matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) actúa como barrera contra el medicamento. En este estudio, se propone a la N-acetilcisteína (NAC) como un fármaco de asociación con  $\text{Ca(OH)}_2$ , debido a su principal mecanismo de acción que consiste en reducir la producción de polisacáridos extracelulares, alterando así el biofilm bacteriano, disminuyendo la carga bacteriana y aumentando la tasa de éxito del tratamiento de conductos.

**Objetivo:** Evaluar la actividad antibacteriana de mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en distintas proporciones por ensayos *in vitro*. **Metodología:** Pruebas de difusión en agar y difusión en caldo, utilizando discos de papel con mezclas de  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC en proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3 (n=3) como medicación intraconducto. Se estudió la actividad antibacteriana a partir de la incubación del inóculo *E. faecalis* en cajas Petri con agar Müller-Hinton y en tubos de hemólisis con Infusión Corazón Cerebro. Se evaluó cada una de las muestras empleando el método de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor en conjunto con los análisis post hoc de Tukey y Bonferroni. La diferencia estadística fue considerada como significativa a  $p < 0.05$ . **Resultados:** Se observó que la incorporación de NAC a las mezclas tuvo influencia en su actividad antibacteriana, demostrándose valores crecientes en este parámetro con su proporción en la formulación. En particular, la mezcla con proporción de 1:1 se destacó como aquella con la mayor actividad antibacteriana. **Conclusiones:** La actividad antibacteriana de las mezclas  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC se validó como moderada con respecto a los controles positivos de antibióticos, tanto en ensayos de contacto directo como de difusión en caldo, con diferencia estadísticamente significativa en la generalidad de los casos ( $p < 0.05$ ).

## **II. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. ENDODONCIA**

La endodoncia es la rama de la odontología que se encarga de estudiar la morfología, fisiología y patología de las cavidades dentarias coronal y radicular, que contienen la pulpa dental y, a su vez, trata las afecciones del complejo dentinopulpar y de la región periapical (1). La pulpa dental, es un tejido conectivo altamente innervado y vascularizado, que se encuentra dentro de una estructura dental mineralizada y desempeña una función crucial en la homeostasis y la sensación del órgano dental. Para poder conservar esta estructura mineralizada, es necesario el tratamiento de conductos, que constituye la parte fundamental de la endodoncia (2).

El tratamiento de conductos consiste en la eliminación de la pulpa dental mediante una secuencia de pasos que intervienen en el control de la infección endodóntica e incluyen la limpieza, conformación, descontaminación y la obturación del sistema de conductos radiculares con el objetivo final de eliminar las bacterias y, por lo tanto, la periodontitis apical. Las bacterias se pueden clasificar o dividir según su localización anatómica, así como el momento en que los microorganismos entran en el sistema del conducto radicular (3).

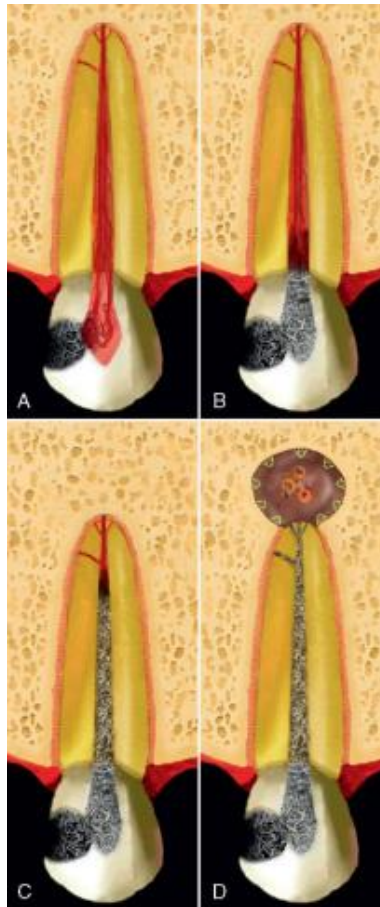
### **2.2. TIPOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS**

La mayoría de las bacterias implicadas en las infecciones endodónticas son habitantes normales de la microbiota oral que toman ventaja de los cambios que se producen en el equilibrio en la relación huésped-bacterias, transformándose en patógenos oportunistas y generando infecciones endógenas. Estas pueden ser dentro o fuera del ápice radicular, conocidas como infecciones extrarradiculares e infecciones intrarradiculares (4,5).

La infección extrarradicular se origina a partir de una colonización bacteriana a los tejidos perirradiculares inflamados, se caracteriza por ser una secuela de una infección intrarradicular, sin embargo, puede ser dependiente o independiente de la infección intrarradicular (4). Por otra parte, la infección intrarradicular se origina a partir de microorganismos que colonizan el sistema de conductos, y se puede subdividir en tres categorías (infección primaria, infección secundaria e infección persistente) que implica el momento en donde los microorganismos entran en el sistema de conductos (4).

### 2.2.1. Infección primaria

Es causada por microorganismos que invaden y colonizan el tejido pulpar necrótico, también conocida como infección inicial. Los microorganismos que participan pueden haber estado involucrados desde la primera fase de la invasión pulpar, mediante una lesión cariosa, traumatismo o procedimiento restaurativo que posteriormente termina en una necrosis pulpar (Figura 1) (5). Se caracterizan por tener una variada comunidad de bacterias anaerobias, de entre 10 a 20 especies por conducto infectado, siendo el tamaño de la lesión apical proporcional a la cantidad de especies bacterianas. Las especies que se identifican con mayor frecuencia en una infección primaria son *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Fusobacterium*, *Dialister*, *Veillonella*, *Campylobacter* y *Treponema* (bacterias gramnegativas), además de *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Olsenella*, *Streptococcus* y *Parvimonas* (bacterias grampositivas) (4,6).



**Figura 1. Proceso de necrosis pulpar a partir de una lesión cariosa**

*En la figura 1 se muestra el proceso de inflamación, necrosis e infección de la pulpa a partir de la exposición de una lesión cariosa, resultando en la formación de una periodontitis apical (4).*

### 2.2.2. Infección secundaria

Es causada por microorganismos que no estuvieron presentes durante la infección primaria, pero invadieron los conductos radiculares después de la intervención del clínico, ya sea durante el tratamiento, entre las citas o una vez finalizado. Para que

sucedan una infección secundaria, es necesario que los microorganismos sobrevivan, se adapten y proliferen, siendo la principal característica de la infección secundaria una lesión apical que aparece después del tratamiento de conductos (4,6).

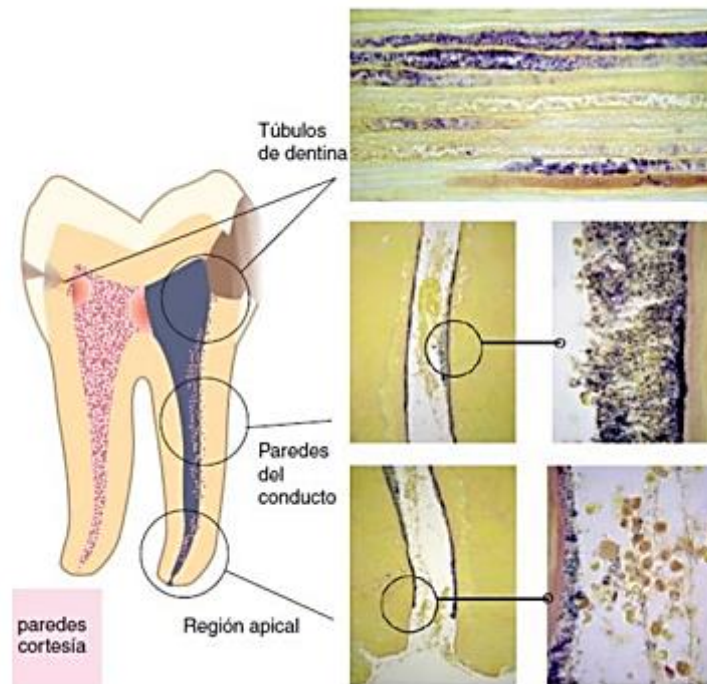
### 2.2.3. Infección persistente

Es causada cuando los microorganismos presentes en la infección primaria o secundaria de alguna manera se resisten a los procesos antimicrobianos que se llevaron a cabo durante el tratamiento de conductos y persisten a pesar de periodos de privación de nutrientes. Los microorganismos que destacan son los grampositivos facultativos o anaerobios como *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) y *Olsenella*. Los dientes previamente tratados endodónticamente con una infección persistente pueden tener entre 1 a 5 especies de bacterias por conducto cuando el tratamiento fue adecuado, si fue inadecuado pueden tener de 10 a 30 especies por conducto, formando una biopelícula, siendo el *E. faecalis* la especie más frecuente, hasta en un 90% de los casos (4,6,7).

### **2.3. BIOPELÍCULA**

Las bacterias en el sistema de conductos pueden estar presentes de dos maneras, ya sea en estado planctónico o a manera de biopelículas. La biopelícula o biofilm, es una condensación de capas delgadas de microorganismos (bacterias, hongos, protozoos) incrustados en una matriz polimérica de producción propia sobre cualquier sustrato superficial orgánico o inorgánico (7–9). Algo a destacar, es que los organismos en las biopelículas asumen un potencial patógeno más fuerte que los microorganismos que están en estado planctónico, esto debido a su estructura, que brinda una protección y mayor resistencia a cualquier influencia externa. Estas agregaciones bacterianas son la causa de la periodontitis apical resistente a la terapia de conductos. También existe evidencia que muestra que los microorganismos cultivados en biopelículas podrían ser de dos a mil veces más resistentes que los correspondientes a la forma planctónica. En las infecciones

persistentes, donde la biopelícula está presente, se han identificado principalmente bacterias anaerobias facultativas siendo las más frecuentemente encontradas *Campylobacter rectus* (*C. rectus*) y *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), especies de *Propionibacterium* predominando *Propionibacterium propionicum* (*P. propionicum*) y *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), especies de *Prevotella* o bacterias gram positivas como *Streptococcus anginosus* (*S. anginosus*), *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*), *Streptococcus oralis* (*S. oralis*), *Streptococcus mitis* (*S. mitis*), *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*), especies de *Actinomyces* como *Actinomyces odontolyticus* (*A. odontolyticus*) y *Actinomyces israelii* (*A. israelii*), especies de *Lactobacillus* como *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) y *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), finalmente, especies de *Enterococcus*, especialmente *E. faecalis*, que destaca de todas las anteriormente mencionadas (7,10).



**Figura 2. Biopelícula bacteriana**

En la figura 2 se muestra la presencia de la biopelícula bacteriana en las paredes internas del conducto radicular en sus diferentes tercios (11).

### 2.3.1. Enterococcus faecalis

La principal causa de fracaso endodóntico es la supervivencia de microorganismos en el sistema de conductos radiculares. El *E. faecalis* es un microorganismo asociado con diferentes formas de enfermedad perirradicular, incluidas infecciones endodónticas primarias e infecciones persistentes que desempeña un papel importante en la etiología ya que puede sobrevivir dentro del conducto radicular como un solo organismo o como un componente principal de la microflora, y es el más comúnmente recuperado del conducto radicular. Se encuentra en del 4 al 40% de las infecciones endodónticas primarias, mientras que en las infecciones endodónticas persistentes ha demostrado una prevalencia que oscila entre el 24 y el 77% (12–14).

#### *2.3.1.2. Morfología y características*

Los *Enterococcus* son cocos grampositivos, anaerobios facultativos con forma ovoide que poseen la capacidad de crecer en presencia o en ausencia de oxígeno, viven en grandes cantidades formadoras de colonias de manera natural en el intestino humano sin causar daño al huésped, además de encontrarse en el tracto genital femenino y en menor frecuencia en la cavidad bucal (13,15). En la actualidad existen 23 especies diferentes de enterococos, en general caracterizándose por sobrevivir en ambientes hostiles, en donde el pH alcalino es muy alto y la concentración de sal, además de resistir diferentes sustancias como detergentes, etanol, sales biliares, entre otros. Catabolizan una variedad de fuentes de energía que incluyen carbohidratos, lactato, glicerol, malato, citrato, arginina y cetoácidos. Pueden crecer en un intervalo de entre 10 a 45 °C y sobrevivir hasta a 60 °C durante aproximadamente 30 minutos. Diferentes estudios han demostrado la capacidad que tiene el *E. faecalis* para trasladarse desde el sistema de conductos hasta los ganglios linfáticos submandibulares (13,16).

### 2.3.1.3. Factores de supervivencia y virulencia

El *E. faecalis* posee ciertos factores de virulencia que incluyen enzimas líticas, citolisina, sustancias de agregación, feromonas y ácido lipoteicoico. Se adhiere a las células huésped, expresando proteínas que le permiten competir con otras células bacterianas, alterando así, las respuestas del huésped (13,14). Además, es capaz de suprimir la acción de los linfocitos, contribuyendo potencialmente al fracaso endodóntico (17). También es capaz de compartir rasgos de virulencia entre especies, lo que contribuye aún más a su supervivencia y a su capacidad de causar enfermedad, de igual manera, tiene la capacidad de habitar los túbulos dentinarios soportando periodos de inanición hasta que tenga disponible algún suministro nutricional, y una vez que lo tiene, utiliza el suero que se origina del hueso alveolar y del ligamento periodontal para poder recuperarse. En conjunto, estos factores pueden o no contribuir a que las características innatas del *E. faecalis* causen enfermedades (13,18). Es la única especie que ha sido ampliamente estudiada por su capacidad para formar biopelículas ya que puede hacer una biopelícula bien organizada que puede resistir el proceso de curación e inducir la precipitación de hidroxiapatita en una biopelícula madura para formar una biopelícula calcificada (19). Se ha demostrado, que el *E. faecalis* puede resistir al hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) durante más de diez días, teniendo la posibilidad de formar una biopelícula que resiste la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos; esto se debe a la penetración de iones en su membrana que amortigua el pH, además de su capacidad de movilizar protones a su interior, proporcionando un medio adicional para mantener su pH y, por lo tanto, su homeostasis (20). Para que el *E. faecalis* pueda desarrollar en la dentina del conducto radicular una biopelícula, se necesitan tres etapas (21,22). La primera etapa, consiste en que las microcolonias se forman a medida que las células del *E. faecalis* se adhieren a la superficie de la dentina del conducto radicular. Posteriormente, la segunda etapa es la disolución mediada por bacterias de la fracción mineral del sustrato que conduce a un aumento en los iones calcio y fosfato, generando una calcificación de la biopelícula del microorganismo.

Finalmente, en la etapa tres, debido a la interacción entre las bacterias y los productos metabólicos de la dentina, la biopelícula se mineraliza (23). Es por esto, que las biopelículas tienen una relevancia clínica particular, ya que los esfuerzos para su eliminación deben incluir un tratamiento mecánico y químico, además de una medicación intraconducto, debido a la compleja anatomía del sistema de conductos radiculares (4).

### **2.4. MEDICACIÓN INTRACONDUCTO**

La medicación intraconducto consiste en la aplicación tópica de medicamentos dentro del sistema de conductos con la intención de lograr efectos terapéuticos locales, complementando la desinfección del sistema de conductos radiculares (4,24,25). En dientes que presentan periodontitis apical y necrosis pulpar es de especial relevancia el uso de una medicación intraconducto, ya que se ha demostrado que la utilización de una medicación entre citas nos obliga a aumentar el tiempo de la preparación quimicomecánica, por lo tanto, resulta ser una estrategia efectiva para el éxito del tratamiento (26,27).

Los medicamentos pueden ser de diferentes tipos, desde antisépticos, antibióticos, corticoesteroides; siendo los antisépticos la medicación más empleada en endodoncia en la actualidad (25).

El objetivo principal de la medicación intraconducto es entonces, erradicar la mayor cantidad de bacterias y microorganismos que la preparación mecánica no logra eliminar. Para que esto pueda ocurrir, es necesario que el medicamento aplicado penetre la dentina y logre entrar en contacto directo con los microorganismos (25).

#### 2.4.1. Características de un medicamento intraconducto ideal

Una medicación intraconducto debe poseer ciertas propiedades específicas, entre ellas destacan la capacidad de eliminar las bacterias persistentes de manera prolongada tras la preparación radicular, la reparación del tejido duro, estabilidad

dimensional, neutralización de residuos remanentes, la reducción de la inflamación de los tejidos periapicales y disminución del exudado, baja tensión superficial, no tener una respuesta inmune del organismo y no teñir la estructura dental, además de minimizar el acceso de las bacterias dentro del conducto a través de una restauración temporal. El  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se ha utilizado ampliamente en endodoncia como medicamento intraconducto, y se le conoce como el estándar de oro, ya que posee muchas de las características mencionadas (4,28).

### 2.5. HIDRÓXIDO DE CALCIO

El  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  fue introducido al campo odontológico en 1920 por Hermann, como un material para recubrimiento pulpar. Sin embargo, no tuvo una aplicación clínica los 25 años posteriores a su descubrimiento (4,29). El  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  posee propiedades biológicas y antibacterianas importantes, además de tener la capacidad para disolver tejido orgánico, inactivar las endotoxinas bacterianas, inhibir la reabsorción radicular e inducir la formación de tejido duro, es por esto, que se ha recomendado a través de los años para diferentes situaciones clínicas, que incluyen recubrimientos pulpares directos e indirectos, apicoformación, apicogénesis, perforaciones y principalmente como medicación intraconducto (29).

En endodoncia, su uso comenzó después de una serie de artículos que documentaban su eficacia antibacteriana, y fue de esta manera, como se extendió su uso rutinario entre citas cuando se realiza un tratamiento de conductos (4,30).

#### 2.5.1. Características químicas

El  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  es un polvo inoloro blanco que se obtiene por calcinación del carbonato de calcio y su transformación en óxido de calcio. Su fórmula química es  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y tiene un peso molecular de 74.08, tiene baja solubilidad en agua (aproximadamente 1.2 g/l a 25 °C), que disminuye a medida que aumenta la temperatura; además tiene un pH alto (de entre 12.5-12.8) que es insoluble en alcohol. Al tener una baja solubilidad, nos brinda una buena característica clínica porque es necesario un largo

período para que el  $\text{Ca(OH)}_2$  se vuelva soluble en fluidos tisulares cuando está en contacto directo con tejidos vitales (31,32). En el  $\text{Ca(OH)}_2$ , el ion calcio nos brinda una acción higroscópica, inmunitaria, mitogénica y eleva el umbral para la iniciación del impulso nervioso, mientras que el ion hidroxilo produce un aumento del pH, posee una acción antimicrobiana y un efecto mineralizador (32).

### 2.5.2. Mecanismos de actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana del  $\text{Ca(OH)}_2$  está relacionada con la liberación de los iones hidroxilos en un ambiente acuoso. Los iones hidroxilos son radicales libres altamente oxidantes que tienen una alta reactividad, reaccionando a muchas biomoléculas generando efectos letales en las células bacterianas a través de diferentes mecanismos que serán descritos a continuación (29).

#### *2.5.2.1. Daño a la membrana citoplasmática bacteriana*

La membrana citoplasmática bacteriana posee diferentes funciones que logran la supervivencia de la célula. Entre ellas destacan la permeabilidad selectiva, el transporte de electrones y fosforilación oxidativa en especies aeróbicas, excreción de exoenzimas, contener enzimas y moléculas transportadoras para la biosíntesis del ADN, polímeros de la pared celular y lípidos de la membrana; además de portar receptores y proteínas de los sistemas quimiotácticos y otros sistemas de transducción sensorial. Los iones hidroxilo del  $\text{Ca(OH)}_2$  inducen la destrucción del componente estructural fosfolípido de la membrana celular eliminando los átomos de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados, generando un radical lipídico libre, este radical lipídico libre reacciona con el oxígeno, lo que resulta en la formación de un radical peróxido lipídico, que elimina otro átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso generando otro peróxido lipídico. Entonces, los peróxidos actúan como radicales libres, iniciando una reacción en cadena auto catalítica y provocando una mayor pérdida de ácidos grasos insaturados y un daño extenso de la membrana (29,33,34).

### 2.5.2.2. *Desnaturalización de proteínas*

El metabolismo celular bacteriano depende en gran parte de la actividad enzimática, las enzimas tienen una actividad y estabilidad óptimas en un rango estrecho de pH, la alcalinización proporcionada por el  $\text{Ca(OH)}_2$  induce la ruptura de los enlaces iónicos que mantienen la estructura terciaria de las proteínas; como consecuencia, la enzima mantiene su estructura covalente pero la cadena polipeptídica se desenreda al azar en una conformación espacial variable e irregular, estos cambios frecuentemente resultan en la pérdida de la actividad biológica de la enzima y la alteración del metabolismo celular. Adicionalmente, las proteínas estructurales también pueden ser dañadas por los iones hidroxilo (35).

### 2.5.2.3. *Daño al ADN*

Los iones hidroxilo reaccionan al ADN bacteriano induciendo la división de las cadenas donde existe pérdida genética, como consecuencia, la replicación del ADN se inhibe y se desorganiza la actividad celular. Además, los radicales libres pueden generar mutaciones letales (29).

Por lo tanto, la evidencia científica señala que pueden ocurrir estos tres tipos de mecanismos de actividad bacteriana en el  $\text{Ca(OH)}_2$ , sin embargo, no es posible identificar cuál es el principal implicado en la muerte celular después de la exposición a esta sustancia altamente básica. Para que esto se lleve a cabo, es necesaria la preparación de una pasta del  $\text{Ca(OH)}_2$  (29,34).

### 2.5.3. Preparación de pasta de hidróxido de calcio como medicación intracondcto

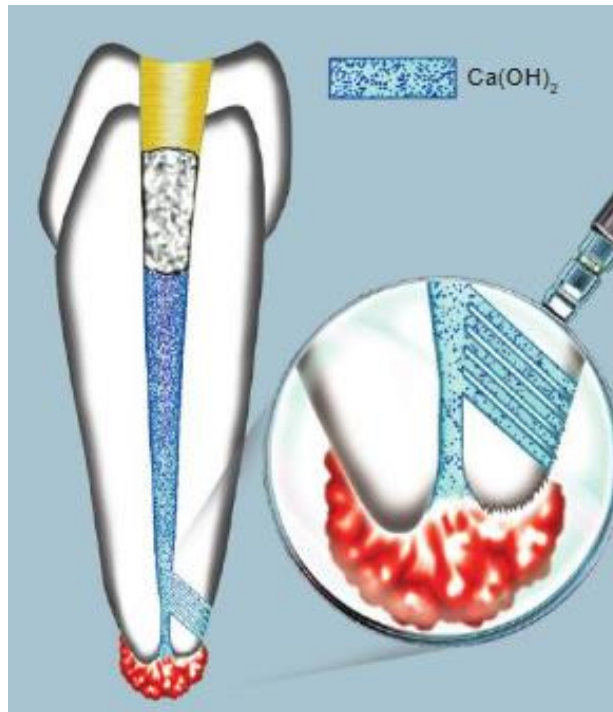
Para poder obtener una pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ , es necesario mezclar el polvo con algún vehículo, que puede ser acuoso, viscoso o aceitoso. El vehículo juega un papel muy importante en el proceso general de la preparación de la pasta porque determina la velocidad de la disociación iónica que hace que la pasta se solubilice y reabsorba por los tejidos periapicales y en el interior del conducto radicular (11).

El vehículo ideal ayudará a mantener la consistencia de la pasta sin fraguarse o endurecerse, mantendrá el pH, mejorará su fluidez, permitirá la liberación gradual de los iones y la difusión a los tejidos y no va a tener un efecto sobre la inducción de la deposición de tejido duro, además de facilitarle al clínico la preparación, colocación y remoción de la pasta (11,35,36). El vehículo acuoso está representado por sustancias solubles en agua, incluyendo agua, solución salina, anestésicos dentales con o sin vasoconstrictor, solución de Ringer, suspensión acuosa de metilcelulosa o carboximetilcelulosa y solución de detergente aniónico. Leonardo *et al.* afirmaron que una pasta preparada con agua u otro vehículo acuoso no tiene buenas propiedades fisicoquímicas debido a que no es radiopaco, es permeable a los fluidos tisulares y se vuelve soluble, reabsorbiéndose desde el área periapical y desde dentro del conducto radicular por lo que esto representa un mayor número de citas hasta lograr el efecto deseado (36).

Los vehículos viscosos están representados por la glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Algunos vehículos viscosos también pueden ser solubles en agua, sin embargo, son menos solubles comparados a los acuosos, esto se puede deber a su alto peso molecular ya que se minimiza la dispersión del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en el tejido y mantiene la acción de la pasta al liberarse los iones a menor velocidad. Es por esto, que la pasta con un vehículo viscoso puede permanecer dentro del conducto radicular entre 2 a 4 meses aproximadamente, permitiendo menor número de citas para lograr el resultado deseado (36).

Los vehículos oleosos son sustancias no solubles en agua, como consecuencia, permiten una mayor difusión de la pasta dentro de los tejidos apicales por un mayor tiempo, a diferencia de las pastas que fueron mezcladas con un vehículo acuoso o viscoso. Los vehículos oleosos pueden ser el aceite de silicona, el alcanfor (el aceite esencial del paraclorofenol alcanforado), aceite de oliva, el acetato de metacresil y algunos ácidos grasos como los ácidos oleico, linoleico e isoesteárico. Este tipo de vehículo tiene un uso limitado, ya que solo se emplea en situaciones donde se requiere una muy baja liberación de iones (36). Por lo tanto, los vehículos

con características hidrosolubles tienen ventajas sobre los vehículos no hidrosolubles, por lo que se recomienda más su uso. Es importante considerar que para que el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  pueda ejercer su función, es necesario que el conducto esté bien conformado, seco y con la permeabilidad dentinaria restablecida, es decir, realizar un lavado final con ácido etildiaminotetracético (EDTA), que va a remover el barrillo dentinario en la entrada de los conductos y permitirá la acción adecuada de la medicación intraconducto sobre la dentina. Una vez que se realiza este protocolo, se debe mezclar el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  con un vehículo hidrosoluble o acuoso hasta crear la consistencia de pasta deseada, una pasta espesa que contenga la mayor cantidad posible de partículas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Para conseguir la máxima efectividad, además de realizar el protocolo mencionado, es importante que el conducto radicular se llene de forma homogénea hasta la longitud de trabajo al momento de colocarse como medicación intraconducto (Figura 3) (11).



**Figura 3. Conducto radicular llenado con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$**

*En la figura 3 se muestra el conducto radicular con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y su difusión a través de los túbulos dentinarios (11).*

Sigue sin definirse cuanto tiempo es necesario para que el  $\text{Ca(OH)}_2$  desinfecte de manera óptima el sistema de conductos radiculares. Es importante considerar todos los factores involucrados, Bystrom *et al.* demostraron que el  $\text{Ca(OH)}_2$  eliminaba eficazmente todos los microorganismos cuando se mantenía dentro del conducto durante 4 semanas. Sin embargo, sigue habiendo variaciones en la evidencia científica en cuanto a la recomendación del tiempo que el  $\text{Ca(OH)}_2$  debe estar dentro del conducto radicular, esto debido a la diversidad de la metodología que utilizan y los tamaños de muestras de los estudios. Adicionalmente, el  $\text{Ca(OH)}_2$  posee limitaciones importantes a considerar (37).

### 2.5.4. Limitaciones del hidróxido de calcio

La manipulación, colocación y remoción del  $\text{Ca(OH)}_2$  representa un reto para el clínico. Para conseguir su máxima efectividad, debe llenarse el conducto radicular a longitud de trabajo y de manera homogénea, ya que necesita estar en contacto íntimo con las paredes dentinarias. Por otra parte, la remoción del  $\text{Ca(OH)}_2$  suele ser incompleta, dejando residuos entre un 20 a 45% en las superficies de la pared de los conductos, incluso tras una irrigación copiosa, como consecuencia, el  $\text{Ca(OH)}_2$  puede interferir en el sellado de nuestra obturación radicular y afectar el éxito de nuestro tratamiento. Además, el  $\text{Ca(OH)}_2$  tiene baja solubilidad y difusión, por lo que se le puede dificultar alcanzar de manera rápida y significativa el pH necesario para eliminar las bacterias, como la biopelícula, especialmente en patógenos como el *E. faecalis*, por lo que se siguen buscando alternativas antibacterianas que en combinación con el  $\text{Ca(OH)}_2$ , logre la erradicación de estos microorganismos (4,37).

## 2.6. MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO CON N-ACETILCISTEÍNA COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

### 2.6.1. N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC, por sus siglas en inglés), es un derivado del aminoácido L cisteína, es un potente antioxidante, contiene tiol y un agente mucolítico que rompe los enlaces disulfuro en la mucosa y reduce la viscosidad de las secreciones. Actualmente, es muy utilizado como tratamiento médico a través de inhalación, vía oral e intravenosa para la bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, intoxicación por paracetamol, fibrosis quística, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, toxicidad por metales pesados. La NAC tiene un excelente perfil de seguridad; entre sus propiedades destaca la antiinflamatoria, ya que inhibe citocinas proinflamatorias; además, tiene propiedades antimicrobianas que disminuyen notablemente la formación de la biopelícula y la adhesión de las bacterias a las superficies (8,38,39).

#### *2.6.1.1. Características antioxidantes*

NAC es un profármaco de cisteína y un precursor del glutatión (GSH) de los aminoácidos de tres componentes del GSH (glutamato, glicina y cisteína), la cisteína tiene la concentración intracelular más baja que ayuda a eliminar los radicales libres y unir los iones metálicos en complejos. Se ha reportado que la suplementación con NAC aumenta los niveles de glutatión, que es el principal antioxidante del cuerpo. Además, el glutatión es de vital importancia para desintoxicar una variedad de sustancias, incluidos los xenobióticos (sustancias químicas ajenas a los sistemas biológicos), compuestos de peróxido y otros radicales libres generando moléculas. Por tanto, ejerce un profundo efecto protector sobre las células. Debido a que la NAC posee actividad antiinflamatoria a través de la inhibición del factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas (NF-κB) y la modulación de la síntesis de citocinas proinflamatorias, se ha utilizado para modular

las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación. Aunque NAC no es un antibiótico, posee propiedades antimicrobianas que descomponen las biopelículas bacterianas de patógenos de importancia médica. Estas características hacen que la NAC sea un candidato potencial para el manejo de enfermedades bucodentales (40,41).

### 2.6.1.2. Actividad antimicrobiana

Se ha propuesto el uso de NAC como un enfoque antibacteriano alternativo para controlar el crecimiento de biopelículas bacterianas en enfermedades humanas. Diversos estudios *in vitro* informaron que NAC disminuye la formación de biopelículas por una variedad de bacterias (39). Las sustancias poliméricas extracelulares (SPEs) en las biopelículas están compuestas principalmente de polisacáridos, pero incluyen otras moléculas como proteínas, ADN extracelular y lípidos. El principal mecanismo de acción de NAC consiste en reducir la producción de polisacáridos extracelulares, alterando las biopelículas maduras y reduciendo la adhesión de bacterias a las superficies. La NAC ha demostrado reducir eficazmente la formación de biopelículas en una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas de importancia médica, incluidas *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Escherichia coli* (*E. coli*) (8). Ya se ha demostrado, que la NAC inhibe el crecimiento de *E. faecalis* y erradica las biopelículas que lo componen (38).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En este trabajo de investigación, se plantea un estudio experimental *in vitro* para evaluar el efecto de la adición de la N-acetilcisteína (NAC) en la actividad antibacteriana de mezclas hidróxido de calcio:N-acetilcisteína ( $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC), propuestas para ser utilizadas como medicación intraconducto.

## IV. JUSTIFICACIÓN

Es bien sabido que la matriz extracelular del biofilm bacteriano inhibe la actividad antibacteriana del  $\text{Ca(OH)}_2$  en el sistema de conductos. Por lo tanto, es necesario la búsqueda de estrategias que aseguren la actividad antibacteriana del  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicación intraconducto. El enfoque propuesto en este proyecto es la combinación del  $\text{Ca(OH)}_2$  con N-acetilcisteína como agente mucolítico para erradicar la producción de matriz extracelular del biofilm bacteriano, evaluando la actividad antibacteriana de las mezclas resultantes a través de ensayos *in vitro*.

## V. HIPÓTESIS

### 5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína utilizadas como medicación intraconducto darán lugar a la mejora del efecto antibacteriano y erradicación el *E. faecalis*, con respecto a la utilización de hidróxido de calcio puro.

### 5.2. HIPÓTESIS NULA (H0)

No se encontrará diferencia estadísticamente significativa al comparar el efecto antibacteriano de las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína, ni entre ellas ni con respecto al hidróxido de calcio puro, en cada tiempo estudiado, con un nivel de confianza del 95%.

### 5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)

Al menos una de las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína presentará diferencia estadísticamente significativa en su efecto antibacteriano con respecto a sus homólogas o con respecto al hidróxido de calcio puro, en cada tiempo estudiado, con un nivel de confianza del 95%.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana de mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en distintas proporciones por ensayos *in vitro*.

### 6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Preparar mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporciones 1:0.3, 1:0.6 y 1:1
- 2) Evaluar la actividad antibacteriana de las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína contra *Enterococcus faecalis*, por ensayos de difusión en agar (24 y 48 h).
- 3) Evaluar la actividad antibacteriana de las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína contra *Enterococcus faecalis*, por ensayos de difusión en caldo (24 h).
- 4) Llevar a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos.

## **VII. VARIABLES**

### **7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES**

1. Mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína a diferentes proporciones.
2. Tiempo de incubación.

### **7.2. VARIABLES DEPENDIENTES**

1. Halo de inhibición.
2. Porcentaje de bacterias en el caldo.

### **7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES**

A las diferentes mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporciones 1:0.3, 1:0.6 y 1:1 se les evaluó la actividad antibacteriana mediante ensayos *in vitro*. Se evaluó la actividad antibacteriana de las muestras obtenidas de cada una de las mezclas de manera cualitativa y cuantitativa a las 24 y 48 h a través de pruebas de difusión en agar y a las 24 h a través de difusión en caldo.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. TIPO DE ESTUDIO

Experimental (*in vitro*).

### 8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO

Para evaluar la actividad antibacteriana se realizaron dos ensayos: i) ensayo de difusión en agar y ii) ensayo de difusión en caldo.

Para el ensayo de difusión en agar se evaluaron tres sistemas y cuatro controles (n = 3):

**Sistema 1:** Mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína en proporción 1:03.

**Sistema 2:** Mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína en proporción 1:06.

**Sistema 3:** Mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína en proporción 1:1.

**Control 1:**  $\text{Ca(OH)}_2$ .

**Control 2:** NAC.

**Control 3:** Agua estéril.

**Control 4:** Gentamicina.

Para el ensayo de difusión en caldo se evaluaron tres sistemas, cinco controles y ocho blancos (n = 3):

**Sistema 1:** Mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína en proporción 1:03 en caldo de cultivo inoculado.

**Sistema 2:** Mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína en proporción 1:06 en caldo de cultivo inoculado.

**Sistema 3:** Mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína en proporción 1:1 en caldo de cultivo inoculado.

**Control 1:**  $\text{Ca(OH)}_2$  en caldo de cultivo inoculado.

**Control 2:** NAC en caldo de cultivo inoculado.

**Control 3:** Agua estéril en caldo de cultivo inoculado.

**Control 4:** Gentamicina en caldo de cultivo inoculado.

**Control 5:** Ampicilina en caldo de cultivo inoculado.

**Blanco 1:** Mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína en proporción 1:03 en caldo de cultivo estéril.

**Blanco 2:** Mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína en proporción 1:06 en caldo de cultivo estéril.

**Blanco 3:** Mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína en proporción 1:1 en caldo de cultivo estéril.

**Blanco 4:**  $\text{Ca(OH)}_2$  en caldo de cultivo estéril.

**Blanco 5:** NAC en caldo de cultivo estéril.

**Blanco 6:** Agua estéril en caldo de cultivo estéril.

**Blanco 7:** Gentamicina en caldo de cultivo estéril.

**Blanco 8:** Ampicilina en caldo de cultivo estéril.

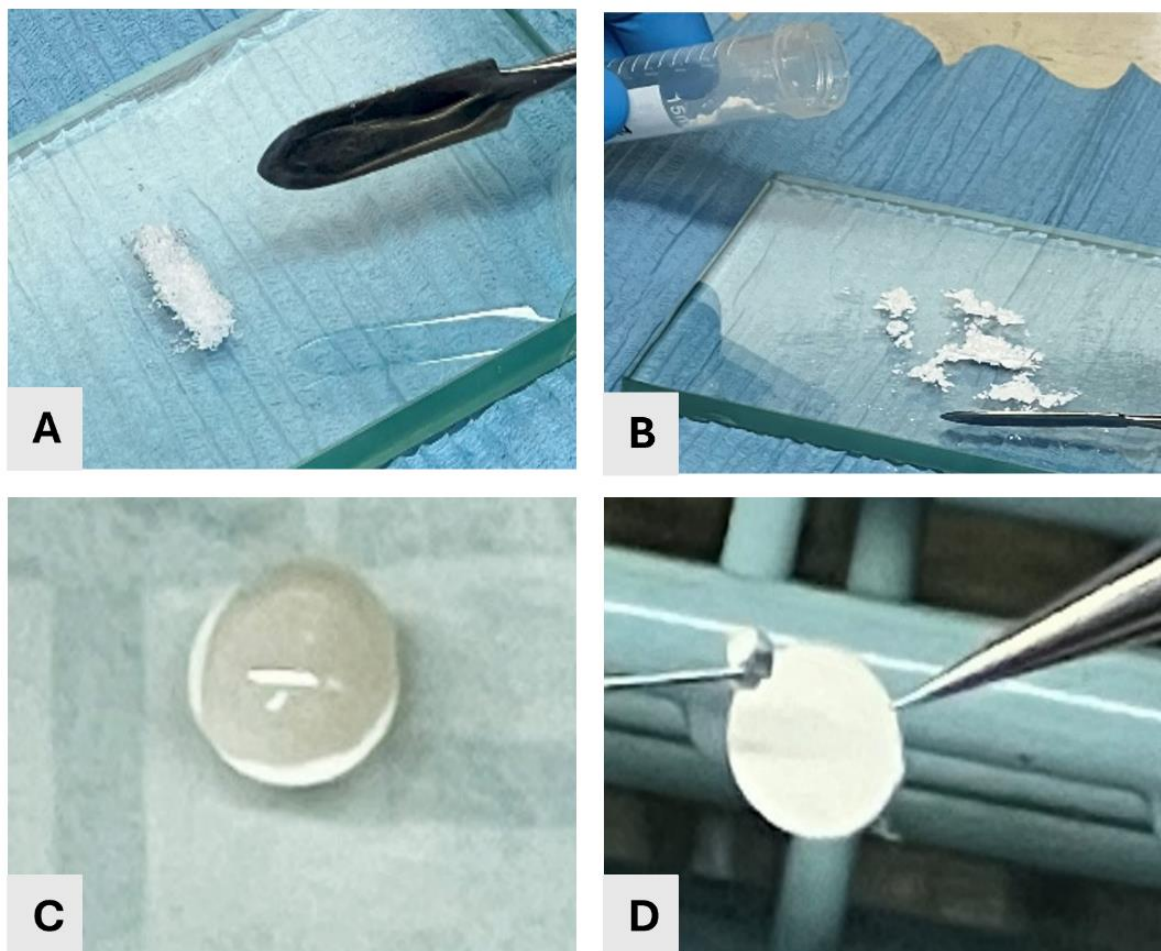
### 8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL

La NAC fue adquirida de Sigma-Aldrich. El  $\text{Ca(OH)}_2$  en polvo fue de la casa comercial Viarden (México). El microorganismo utilizado fue una cepa clínica de *E. faecalis* donada por Laboratorio Zapata (Tijuana, México). Los antibióticos empleados como controles fueron sulfato de gentamicina de la casa comercial CDH y ampicilina en discos cargados con 10 mcg de la marca BIO-RAD (Francia). Las muestras se dispensaron en discos de papel de filtro cualitativo 413 de 6 mm de diámetro de la marca VWR. Se utilizó como medio de conservación bacteriano Agar de Soya Trypticaseína (TSA, por sus siglas en inglés) de la marca TM Media. Como medios de cultivo bacteriano se empleó agar Müeller Hinton (BD Bioxon, México) e Infusión Corazón Cerebro (BHI, por sus siglas en inglés) de la marca MCD Lab. Se empleó una microbalanza analítica modelo BL 150 de la marca Sartorius (Estados Unidos), un agitador digital vórtex de la marca VWR TROEMNER (Estados Unidos). Para incubar la cepa de *E. faecalis* en presencia de las muestras de interés se empleó una incubadora PRECISION (Virginia, Estados Unidos). Para medir el halo de inhibición se empleó un vernier digital marca Truper (México). Toda la experimentación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical LABCONCO PURIFIER CLASS II BIOSAFETY CABINET (Estados Unidos). Para la caracterización por UV se empleó un espectrofotómetro Genesys10S UV-Vis y cubetas de vidrio de 1/2" de diámetro de la marca Thermo Scientific (Estados Unidos). Adicionalmente, se emplearon cajas Petri de 90 x 15 mm, mechero de alcohol metálico, asa de siembra metálica, hisopos estériles de la marca PROTEC (México) y jeringas de insulina de 1 ml de la marca Diabelab (México), entre otros.

## 8.4. METODOLOGÍA

### 8.4.1. Preparación de las muestras

Para la preparación de las mezclas de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína (Sistemas 1-3), los granos de NAC fueron triturados con una espátula de cemento en loseta de vidrio hasta obtener un polvo fino; después la NAC fue mezclada con el polvo de  $\text{Ca(OH)}_2$  en las proporciones 1:03, 1:06 y 1:1 hasta obtener una mezcla homogénea de los polvos. Posteriormente, se agregaron 207.9 mg de polvo de las muestras objeto de estudio sobre una loseta de vidrio y se añadió por goteo ca. 175  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril, mientras se realizaba la mezcla con ayuda de una espátula hasta tener una mezcla homogénea con consistencia de pasta blanda. Para la preparación de las muestras de los Controles 1 y 2 (los polvos de  $\text{Ca(OH)}_2$  y NAC, respectivamente), los polvos fueron mezclados por separado siguiendo la relación de polvo/líquido y procedimiento arriba mencionados, hasta obtener una pasta con consistencia de pasta blanda. Finalmente, para los análisis de actividad antibacteriana, se depositaron ca. 10  $\mu\text{l}$  de las pastas de cada muestra objeto de estudio sobre discos de papel filtro de 6 mm de diámetro estériles con ayuda de una espátula para cemento. Para la preparación de los Controles 3 y 4, se dispensaron 10  $\mu\text{l}$  de agua estéril y solución de gentamicina (10  $\mu\text{g/ml}$ ), respectivamente, sobre los discos de papel filtro (Figura 4).



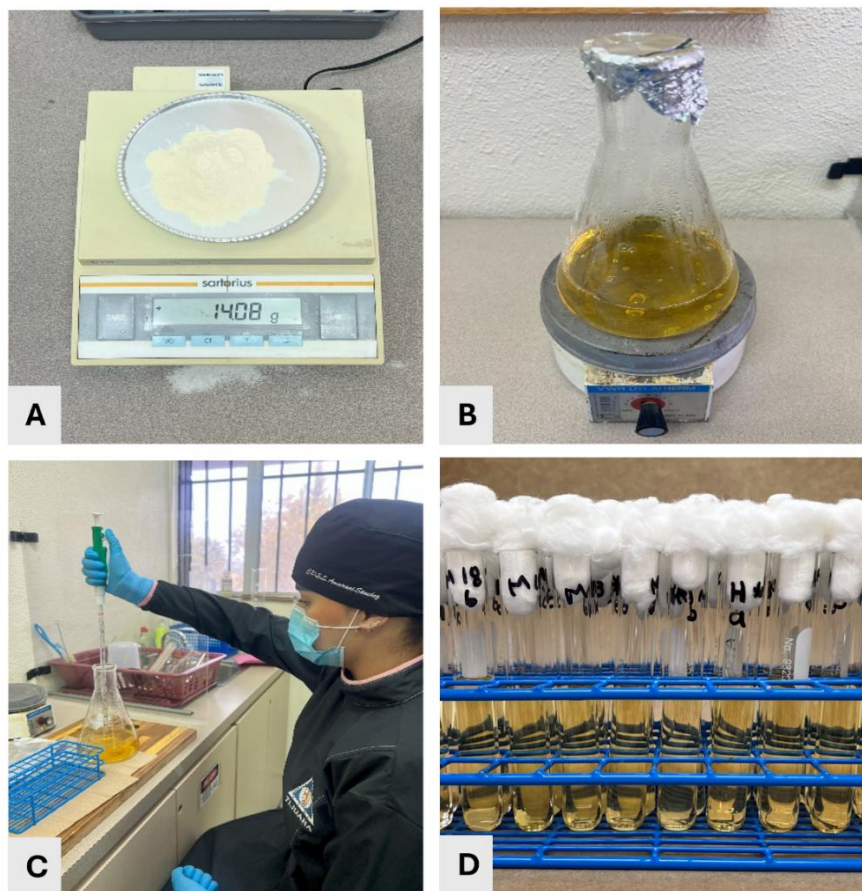
**Figura 4. Preparación de las muestras**

*En el panel (A) se observan los granos de NAC previo a ser triturados, en el panel (B) la mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$ :N-acetilcisteína, en el panel (C) se observa el disco de papel con la mezcla, en el panel (D) la colocación de agua estéril en disco de papel.*

#### 8.4.2. Preparación del caldo de cultivo BHI

Se preparó el caldo BHI siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pesó la cantidad requerida del polvo de BHI en una microbalanza analítica y el polvo fue disuelto en agua destilada en el interior de un matraz Erlenmeyer, por agitación empleando una parrilla con temperatura, hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, el caldo de cultivo se alicuotó en tubos de vidrio para hemólisis con

5 ml de BHI empleando una pipeta serológica. Los tubos de vidrio con el caldo BHI fueron tapados con torundas de algodón y esterilizados a 121 °C durante 15 min (Figura 5). El medio de cultivo fue almacenado a 4 °C hasta su uso.



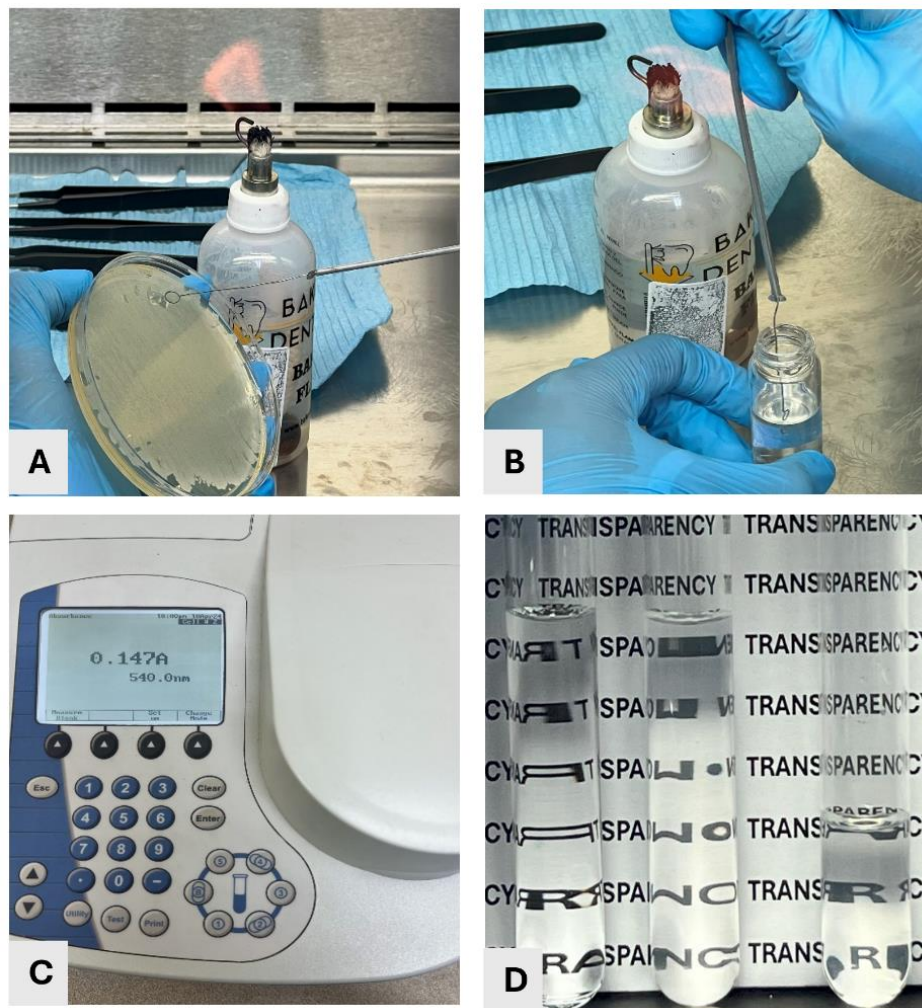
**Figura 5. Preparación del medio de cultivo y esterilización**

En el panel (A) se muestra el medio de cultivo en polvo, en el panel (B) se observa la disolución del medio, en el panel (C) alicuotado de medio de cultivo en tubos de vidrio y en el panel (D) el caldo de cultivo en los tubos previo a esterilización.

#### 8.4.3. Preparación de la suspensión madre de *E. faecalis*

Se preparó una suspensión madre de *E. faecalis* a partir de una placa de TSA que fue sembrada con el microorganismo con 24 h de antelación. Para ello, con un asa de siembra estéril se tomó la cepa de *E. faecalis* y se depositó en 10 ml de solución

salina estéril (0.9%); después la suspensión se homogeneizó empleando un agitador Vórtex. La suspensión madre de bacterias fue ajustada a una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de McFarland, que corresponde a  $0.5 \times 10^8$  UFC/ml (42). La absorbancia de la muestra fue medida con un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm (Figura 6).

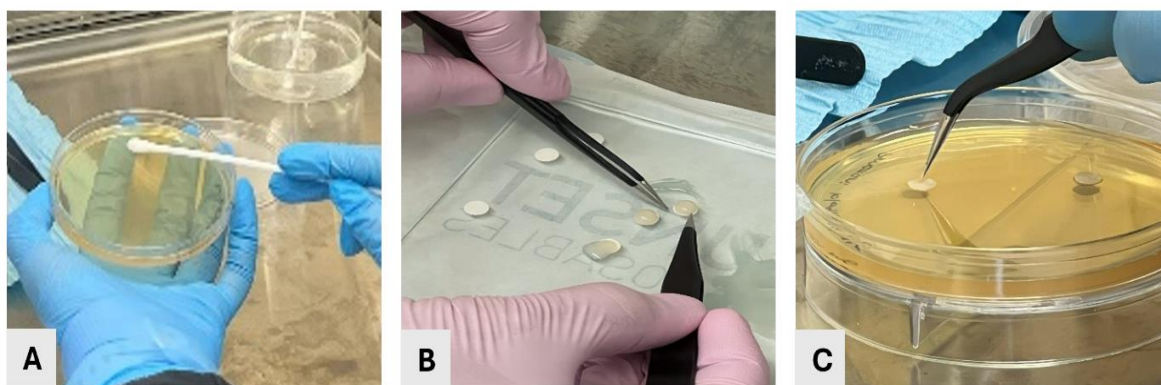


**Figura 6. Preparación de la solución madre de bacterias**

En los paneles (A) se observa la recolección de *E. faecalis* tras 24 h de incubación en condiciones de cultivo bacteriano, en el panel (B) la colocación de *E. faecalis* en 10 ml de solución salina estéril (0.9%), en el panel (C) la obtención de solución madre con absorbancia de 0.147 A, en el panel (D) se observa la similitud en la turbidez de los tubos de hemólisis, de izquierda a derecha se observa: Agua estéril, McFarland, solución madre de *E. faecalis*.

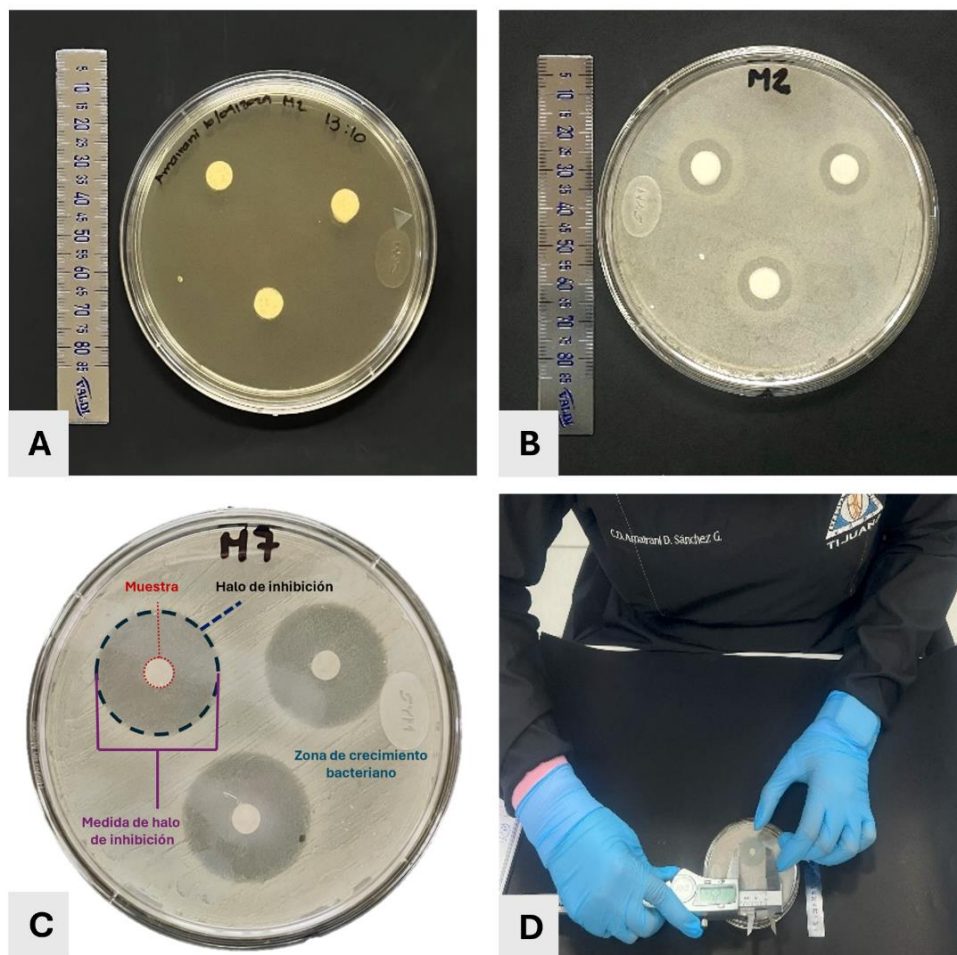
#### 8.4.4. Ensayo de difusión en agar

Para el ensayo de difusión en agar, las placas de Petri con agar Müeller Hinton fueron inoculadas con *E. faecalis* empleando un hisopo estéril impregnado con ca. 150  $\mu$ l de la suspensión madre (ver sección 8.4.3.). El hisopo se deslizó suavemente sobre la superficie del agar, con movimientos de izquierda a derecha, hasta cubrir la totalidad de la superficie; el procedimiento fue realizado en tres direcciones (con una rotación de 60° para cambiar de dirección). Una vez inoculado el agar con *E. faecalis*, los discos de papel filtro con las muestras objeto de estudio (ver sección 8.4.1.) fueron colocados asegurando el íntimo contacto de las muestras sobre la superficie del agar (Figura 7). Posteriormente, las placas de Petri fueron incubadas hasta 48 h a 37 °C y 100% de humedad. Finalmente, el halo de inhibición de las muestras fue medido a los tiempos de 24 y 48 h empleando un calibrador vernier digital (Figura 8).



**Figura 7. Ensayo de difusión en agar**

*En el panel (A) se está realizando la inoculación de la placa con *E. faecalis*, en el panel (B) la aplicación de la pasta en cada disco y en el panel (C) la colocación de discos con pasta en las placas de agar asegurando un espacio adecuado a su alrededor para el halo de inhibición.*



**Figura 8. Control y registros**

En el panel (A) se observa la muestra 2 que corresponde a sistema 2 a las 0 h, en el panel (B) a las 24 h, en el panel (C) se observa un esquema de halo de inhibición, en el panel (D) se observa la medición de halo de inhibición con vernier digital.

#### 8.4.5. Ensayo de difusión en caldo

Para el ensayo de difusión en caldo, las muestras objeto de estudio fueron dispensadas en discos de papel filtro (ver sección 8.4.1.). Después, los discos con las muestras fueron depositados en el interior de tubos de vidrio para hemólisis con 5 ml de caldo BHI estéril (ver sección 8.4.2.). Posteriormente, el caldo de cultivo fue inoculado con 10  $\mu$ l de suspensión madre de *E. faecalis* (ver sección 8.4.3.)

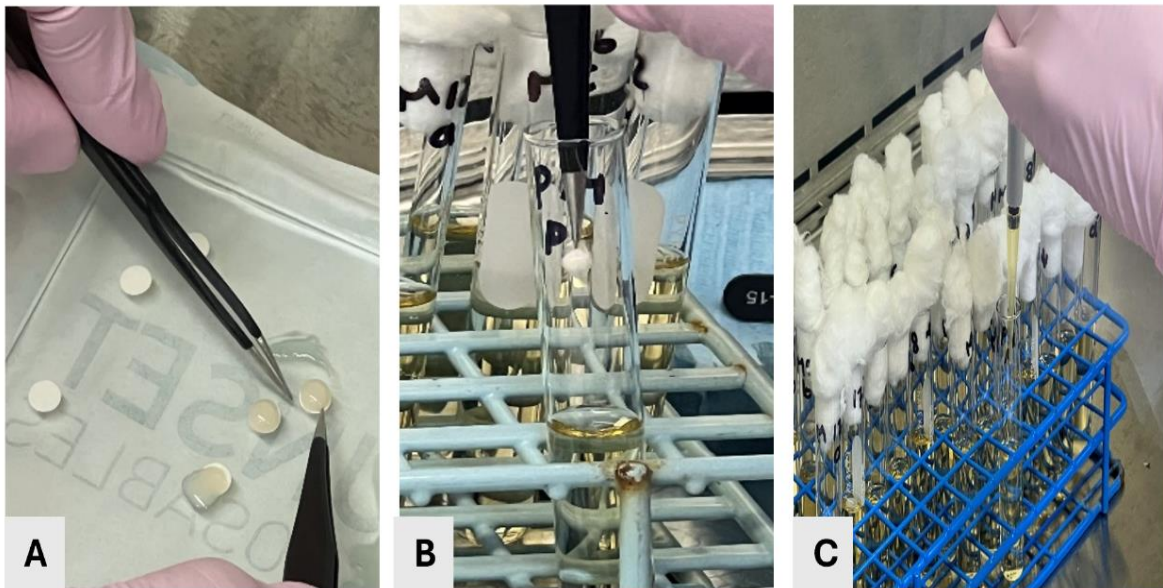
empleando una micropipeta (Figura 9). Posteriormente, los tubos fueron incubados durante 24 h a 37 °C y 100% de humedad.

Tras su incubación por 24 h en condiciones de cultivo bacteriano, todos los tubos de hemólisis (incluyendo sistemas, controles y blancos) fueron puestos a contraluz para evaluar cambios en la turbidez de cada caldo de cultivo y se adquirieron fotografías (caracterización a través de ensayos organolépticos). Posteriormente, se extrajeron 2 ml de caldo de cultivo de cada tubo de hemólisis y fueron depositados en el interior de una cubeta de vidrio. La absorbancia de cada muestra fue medida con un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm. Previo a su medición, cada muestra fue homogeneizada por aspiración y depósito suave con una micropipeta, cuidando que no se formaran burbujas (Figura 10). El porcentaje de *E. faecalis* presente en cada medio de cultivo fue calculado a través de la siguiente expresión:

**Ecuación 1. Bacterias en caldo (%).**

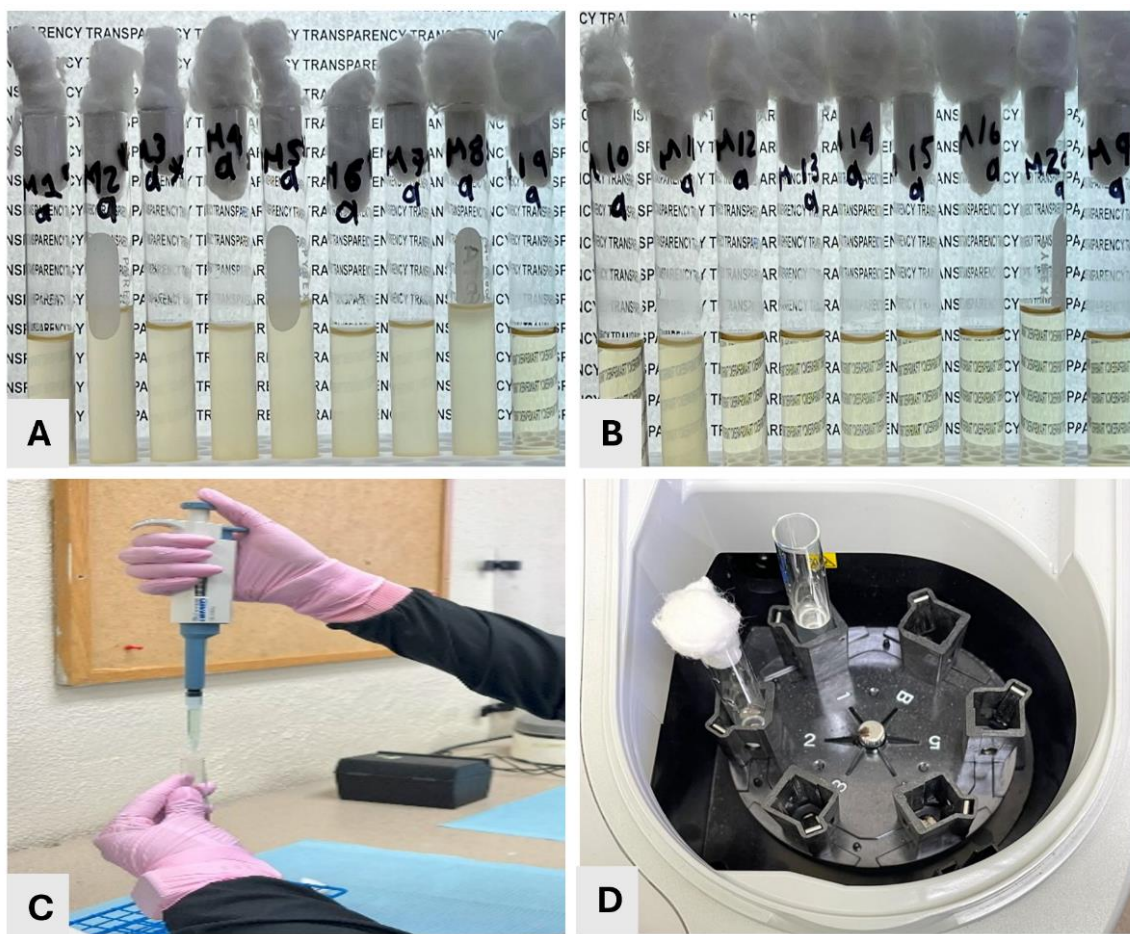
$$\text{Bacterias en el caldo (\%)} = \frac{Am}{AT} * 100$$

donde: **Am** representa la absorbancia promedio de cada muestra de interés y **AT** representa la absorbancia promedio de control.



**Figura 9. Colocación de discos y solución madre**

*En el panel (A) se observa la pasta colocada en discos de papel, en el panel (B) la colocación del disco en tubo de hemólisis, en el panel (C) la inoculación de tubos con solución madre.*



**Figura 10. Caracterización a través de espectroscopia de UV**

*En el panel (A) se observan las muestras inoculadas con bacterias a las 24 h, mientras que en el panel (B) se observan las muestras que no se inocularon con bacterias a las 24 h posterior a su incubación, en el panel (C) se tomaron los 2 ml de muestra con micropipeta para colocarlos en cubetas de vidrio, en el panel (D) se observa la muestra en el espectrofotómetro para realizar el registro de la absorbancia.*

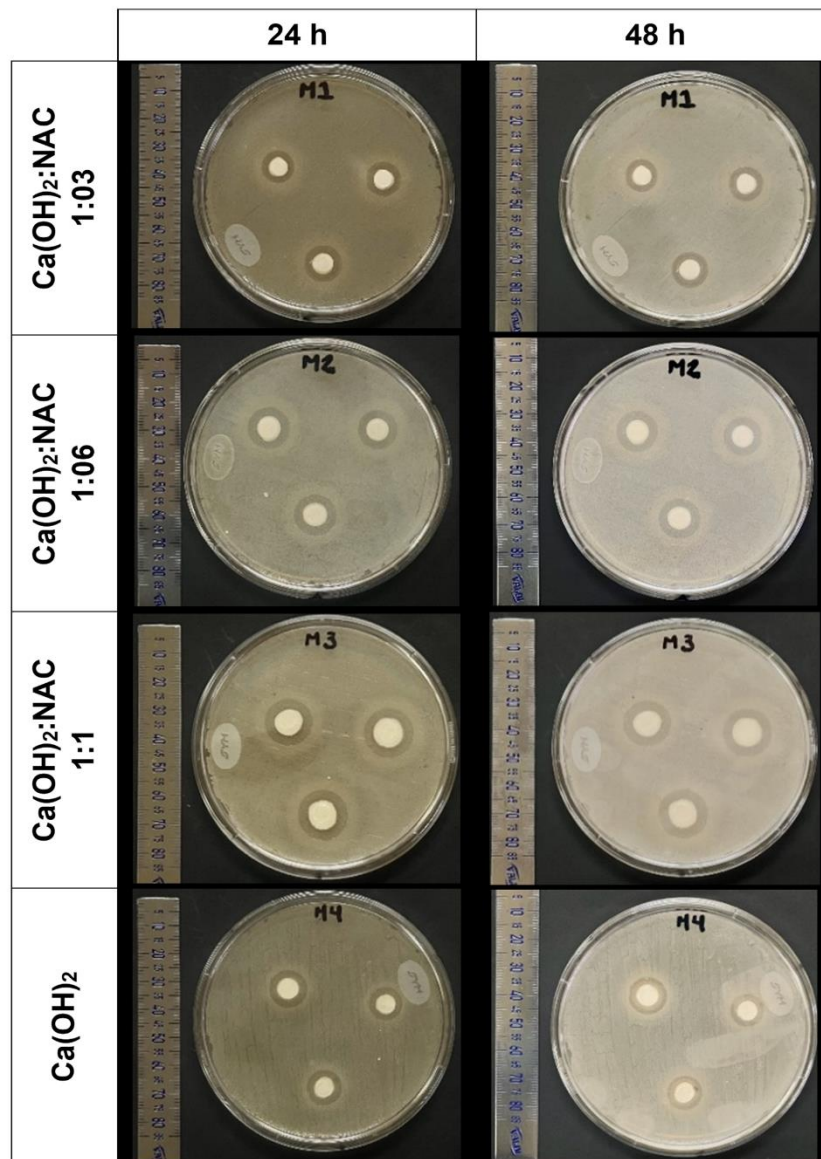
### 8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando el método de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor en conjunto con los análisis post hoc de Tukey y Bonferroni. La diferencia estadística fue considerada como significativa a  $p < 0.05$ .

## IX. RESULTADOS

## 9.1. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR A 24 Y 48 h

En la Figura 11 se muestra la actividad antibacteriana de las mezclas de  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC contra *E. faecalis* (halo de inhibición, 24 y 48 h). Se observa que todas las mezclas objeto de estudio presentan halo de inhibición.



continúa...

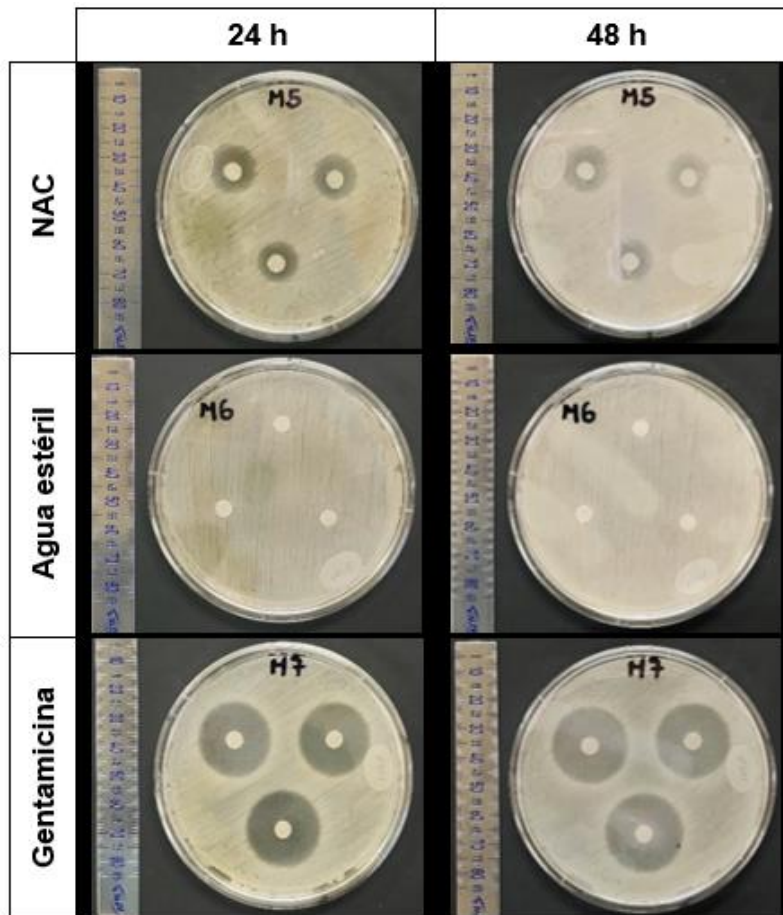
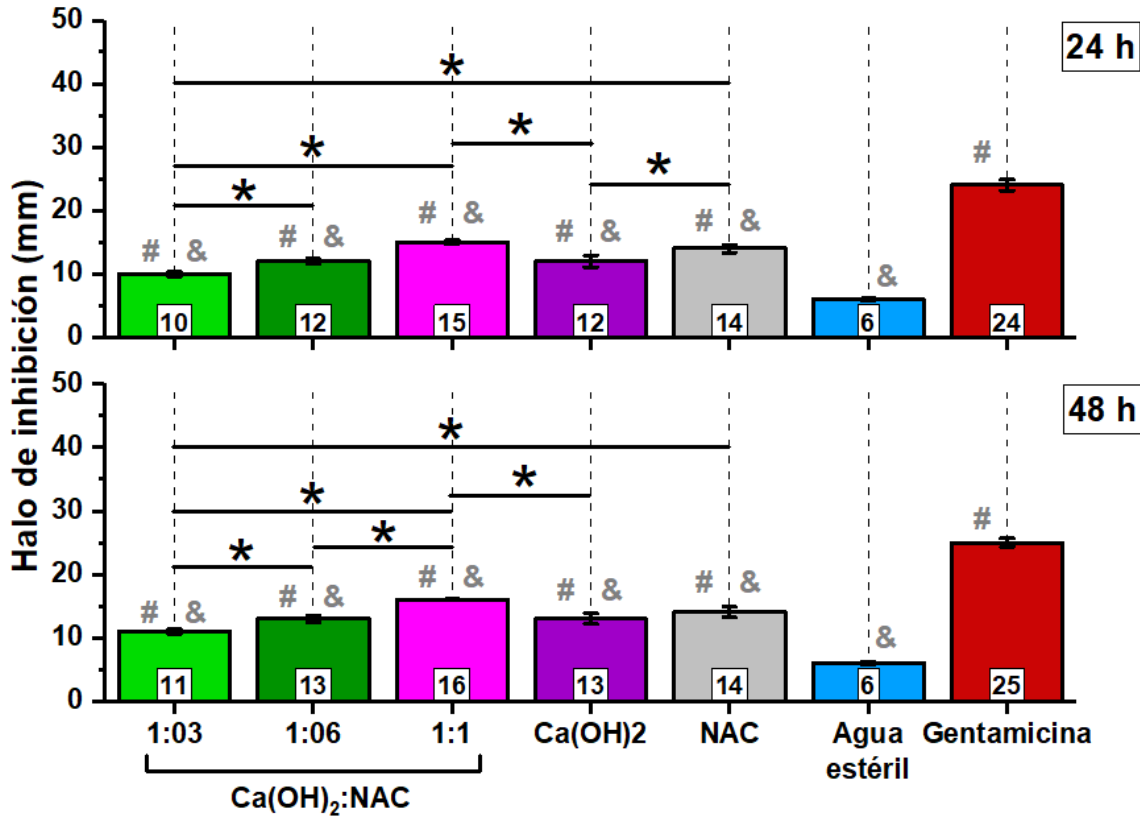


Figura 11. Ensayo de difusión en agar después de su incubación a las 24 y 48 h.

En la figura se muestran las cajas de Petri de agar Müller Hinton inoculadas con *E. faecalis* en las que se colocaron discos de papel impregnados con las muestras con los Sistemas 1-3 y los Controles 1-4 posterior a 24 y 48 h de incubación.



**Figura 12. Halo de inhibición bacteriana tras la incubación de las muestras en contacto con las bacterias por 24 y 48 h.**

Las columnas representan el promedio de los resultados obtenidos para al menos tres experimentos con cada formulación (ver sección experimental). Las barras verticales representan la desviación estándar. Se estudiaron como blancos de comparación bacterias en presencia de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Control 1), bacterias en presencia de NAC (Control 2), bacterias en presencia de agua estéril (Control 3) y bacterias en presencia de gentamicina (Control 4). Los símbolos # y & denotan diferencia estadísticamente significativa con respecto a agua estéril y gentamicina, respectivamente; el símbolo \* denota diferencia estadísticamente significativa entre cada par de muestras señaladas;  $p < 0.05$  en todos los casos.

La Figura 12 muestra la actividad antibacteriana de las mezclas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :NAC empleadas como medicación intraconduco, obtenida a partir de ensayos de contacto directo contra *E. faecalis* en agar por 24 y 48 h. En general, se observa que todas las muestras presentan actividad antibacteriana con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (negativo) de agua estéril, con halos de inhibición que van desde los 10 hasta los 16 mm, sin presentar

influencia aparente del tiempo. No obstante, esta actividad demostró ser moderada en todos los casos con respecto al control (positivo) de gentamicina; mismo que demostró un halo de inhibición de entre 24 y 25 mm, con diferencia estadísticamente significativa con respecto a todas las muestras de interés ( $p < 0.05$ ), igualmente sin influencia aparente del tiempo. Por otro lado, al comparar las mezclas  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :NAC entre sí, se observó que la incorporación de NAC tuvo influencia en su actividad antibacteriana, demostrándose valores crecientes en este parámetro con su proporción en la formulación. En particular, la mezcla con proporción de 1:1 se destacó como aquella con la mayor actividad antibacteriana, con diferencia estadísticamente significativa con respecto al  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  puro ( $p < 0.05$ ), en ambos periodos de tiempo.

## 9.2. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN CALDO A 24 h

En la Figura 13 se muestra la actividad antibacteriana de las mezclas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :NAC empleadas como medicación intraconducto contra *E. faecalis*, a partir de ensayos por difusión en caldo (24 h).



**Figura 13. Fotografía representativa de los Sistemas y Controles objeto de estudio después de 24 h de incubación con la bacteria *E. faecalis***

Imagen: Caldo de cultivo inoculado (\$),  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :NAC 1:03 en caldo de cultivo inoculado (Ç),  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :NAC 1:06 en caldo de cultivo inoculado (!),  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :NAC 1:1 en caldo de cultivo inoculado (%),  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en caldo de cultivo inoculado (i), NAC en caldo de cultivo inoculado (@), gentamicina en caldo de cultivo inoculado (&), agua estéril en caldo de cultivo inoculado (#), ampicilina en caldo de cultivo inoculado (+).

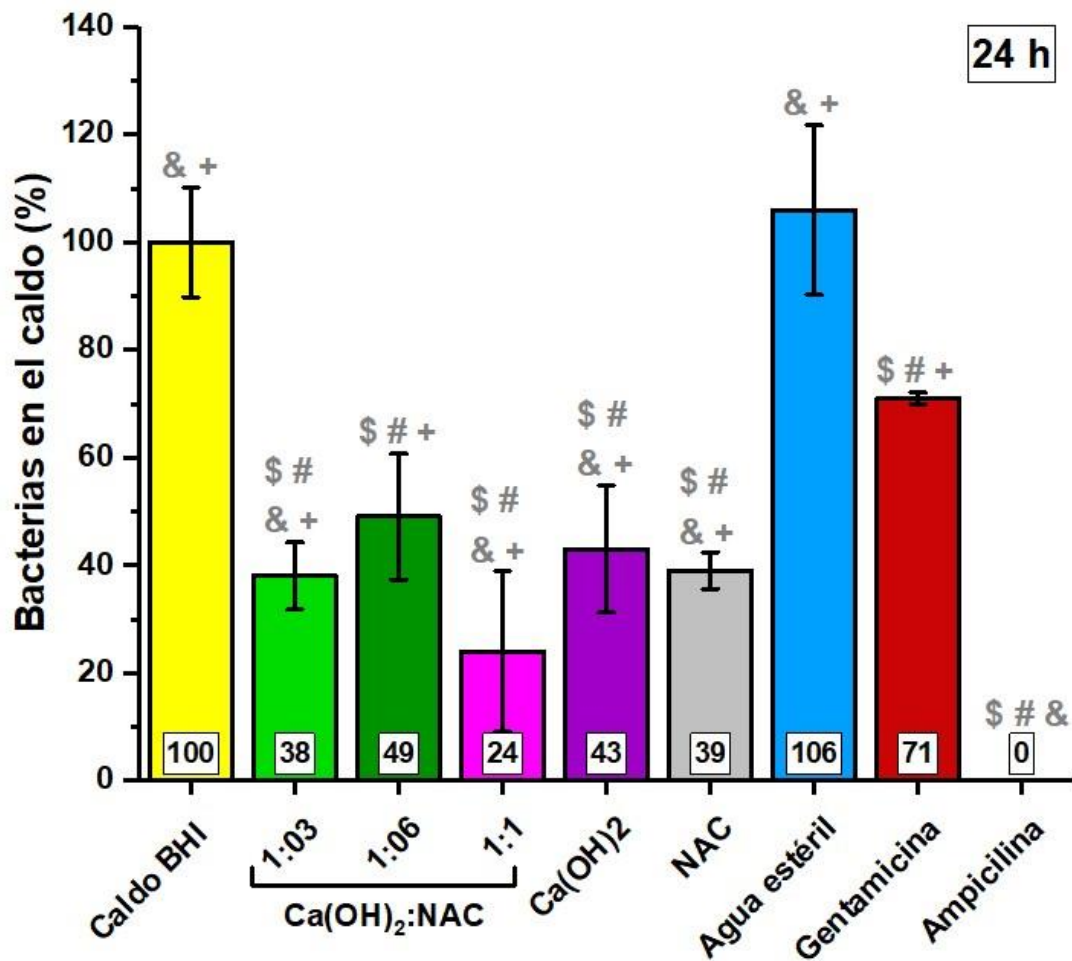


Figura 14. Porcentaje de bacterias *E. faecalis* encontradas en el caldo de cultivo tras su incubación en presencia de  $\text{Ca(OH)}_2$ , NAC, Agua estéril, Gentamicina, Ampicilina y mezclas de  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC a diferentes proporciones por 24 h.

Las columnas representan el promedio de los resultados obtenidos y las barras verticales representan la desviación estándar ( $n = 3$ ), de acuerdo con la Ecuación 1. Los símbolos \$, &, #, +, denotan diferencia estadísticamente significativa con respecto al caldo BHI, gentamicina, agua estéril y ampicilina; respectivamente ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 14 se muestra la actividad antibacteriana de las mezclas de  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC, a partir de ensayos de dilución en caldo contra *E. faecalis* a 24 h. En concordancia con el ensayo de contacto directo, con excepción de la mezcla  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC 1:06, todas las mezclas objeto de estudio demostraron actividad antibacteriana con diferencia estadísticamente significativa con respecto a los

controles ( $p < 0.05$ ); confirmando la respuesta observada en el ensayo de contacto directo.

Por otro lado, al comparar la actividad de las mezclas  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :NAC entre sí, en concordancia con lo observado por el ensayo de contacto directo, la mezcla con proporción de 1:1 se destacó como aquella con la mayor actividad antibacteriana de las tres objeto de estudio (76% de inhibición), con actividad antibacteriana incluso mayor a la muestra de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  puro (57% de inhibición). Sin embargo, los resultados de este ensayo no arrojaron diferencia estadísticamente significativa en la actividad de ninguna de las mezclas ( $p > 0.05$ ), sugiriendo que su respuesta se da preferentemente por contacto directo con las bacterias y se compromete aparentemente con su dilución en el caldo.

## X. DISCUSIÓN

El hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) ha sido recomendado a través de décadas debido a sus destacadas propiedades biológicas (43). Entre ellas, destaca su efecto antibacteriano por su alta alcalinidad, ya que altera la membrana citoplasmática de los microorganismos (43,44). Sjogren *et al.* demostraron que la aplicación de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  por 7 días fue suficiente para reducir las bacterias del conducto radicular a un nivel importante, donde los cultivos daban negativo (45); sin embargo, Estrela *et al.* realizaron un estudio en el que cultivaron cepas de microorganismos: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* y una mezcla de estos, posteriormente se inocularon en un agar de infusión cerebro corazón e incubaron a 37 °C durante 24 h. La muestra fue de 63 incisivos que se dividieron en cinco grupos; se inocularon e incubaron por 28 días usando nuevos cultivos a intervalos de 0, 48 h, 72 h y 7 días, después los dientes se sumergieron en 5 ml de infusión e incubaron por 48 h para observar el crecimiento y multiplicación de cada microorganismo, teniendo como resultados que el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en túbulos dentinarios infectados no mostró ningún efecto antimicrobiano sobre los microorganismos o la mezcla de estos, por lo que comprueba la limitante del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para eliminar la biopelícula (46).

Debido a la incapacidad que demuestra tener el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para eliminar la biopelícula, especialmente al *E. faecalis*, existe una creciente preocupación por investigar más compuestos con acciones antimicrobianas. La NAC ha reportado ser eficaz en la reducción de la producción de polisacáridos extracelulares, interrumpiendo biopelículas maduras y reduciendo la adhesión en las superficies, Quah *et al.* realizó un estudio mediante la exposición de biopelículas del *E. faecalis* de 21 días a NAC para evaluar su eficacia antibacteriana. La cepa bacteriana se cultivó en un agar de infusión cerebro corazón a 37 °C con agitación a 100 rpm, la NAC se disolvió en el agar de cerebro corazón en una concentración de 200 mg/ml y su pH se ajustó con la utilización de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . La concentración inhibitoria mínima (CIM) de NAC se determinó mediante un ensayo de microdilución en caldo; se utilizó

una placa de 96 pocillos de 100 ml, donde la NAC se inoculó con 100 ml de *E. faecalis* para posteriormente determinar el crecimiento bacteriano después de la incubación durante 24 horas; además, se examinó la capacidad de la dentina en polvo para neutralizar la actividad antibacteriana de NAC y  $\text{Ca(OH)}_2$  se incluyó como comparación. Los resultados fueron que el NAC fue más bactericida a un pH de 11 con una CIM de 1.56 mg/ml y concentración bactericida mínima (CBM) de 12.5 mg/ml, eliminando por completo la biopelícula de *E. faecalis* sin tener ninguna afectación por la presencia de dentina, que neutraliza la acción antimicrobiana del  $\text{Ca(OH)}_2$  (47).

La asociación de NAC al  $\text{Ca(OH)}_2$  aumenta la actividad antibacteriana y, por lo tanto, la eliminación de la biopelícula. Esto se puede constatar en la revisión sistemática que realizaron Abdulrab *et al.* en la que realizaron una búsqueda en diferentes bases de datos, incluyendo estudios clínicos e *in vitro*, estudios donde los efectos de la NAC se compararán con algún otro irrigante o medicamento intraconducto. De 193 artículos, solo 15 cumplieron con los criterios, donde 13 fueron estudios *in vitro* que evaluaron la actividad antibacteriana de NAC, informando una eficacia buena y prometedora, del mismo nivel o incluso mejor que la clorhexidina, hipoclorito de sodio e  $\text{Ca(OH)}_2$  (48). Dichos hallazgos destacan a la NAC como un fármaco atractivo en combinación con el  $\text{Ca(OH)}_2$  para emplearse como medicación intraconducto, ya que favorece la actividad antimicrobiana del  $\text{Ca(OH)}_2$ , aunado a las excelentes propiedades regenerativas y antioxidantes de la NAC.

## XI. CONCLUSIONES

- 1.- Las mezclas  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC presentaron actividad antibacteriana contra *E. faecalis* tanto en ensayos de contacto directo como de dilución en caldo, en función de la proporción de NAC en la mezcla, con diferencia estadísticamente significativa con respecto a controles negativos en todos los casos ( $p < 0.05$ ).
- 2.- La actividad antibacteriana de las mezclas  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC se validó como moderada con respecto a los controles positivos de antibióticos, tanto en ensayos de contacto directo como de dilución en caldo, con diferencia estadísticamente significativa en la generalidad de los casos ( $p < 0.05$ ).
- 3.- La incorporación de la NAC en las mezclas  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC mejoró su actividad antibacteriana contra *E. faecalis*, particularmente en la formulación con proporción de 1:1 ( $p < 0.05$  en el ensayo de contacto directo).
- 4.- Con base a los resultados obtenidos, se confirma la hipótesis alternativa (H1) de este proyecto.

## **XII. RECOMENDACIONES**

- 1.- Determinar la concentración mínima inhibitoria de las mezclas  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC en los ensayos de dilución en caldo.
- 2.- Determinar el mecanismo de actividad de las mezclas  $\text{Ca(OH)}_2$ :NAC (bactericida o bacteriostático).

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez-Niklitschek C, Oporto GH. Working length determination in endodontics. Clinical issues of dental root and root canal systems morphology. *Int J Odontostomat.* 2014;8(2):177–83.
2. Sone PP, Kaneko T, Zaw SYM, Sueyama Y, Gu B, Murano H et al. Neural regeneration/remodeling in engineered coronal pulp tissue in the rat molar. *J Endod.* 2020 Jul 1;46(7):943–9.
3. Li H, Guo Z, Li C, Ma X, Wang Y, Zhou X, et al. Materials for retrograde filling in root canal therapy. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2021 Dec 17;(10).
4. Hargreaves KM, Berman LH, Cohen S. *Vías de la pulpa.* 11va ed. Barcelona, España: Elsevier; 2014.
5. Negroni M. *Microbiología estomatológica.* 2da ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana; 2010.
6. Upegui L, Molina D. Susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos anaerobios aislados de infecciones endodónticas primarias a amoxicilina y metronidazol y su asociación con los parámetros clínicos: serie de casos. *Int J Odontostomat.* 2016;10(1):149–59.
7. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J.* 2022 May 1;55(S3):512–30.
8. Moon JH, Choi YS, Lee HW, Heo JS, Chang SW, Lee JY. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *Journal of Microbiology.* 2016 Apr 1;54(4):322–9.
9. Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics.* 2004;9(1):27–36.

10. Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Arena C, Caponio VCA, Caloro GA et al. Inspection of the microbiota in endodontic lesions. *Dent J*. 2019 Jun 1;7(2):47.
11. Canalda Sahli C, Aguade EB. *Endodoncia: Técnicas Clínicas Y Bases Científicas*. 4ta ed. España: Elsevier; 2019.
12. Sans-Serramitjana E, Betancourt P. Is *Enterococcus faecalis* the most common microorganism involved in post-treatment endodontic infections? *J Oral Res* . 2021 Dec 21;10(5):1–2.
13. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* . 2006 Feb;32(2):93–8.
14. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* . 2004;30(5):315–20.
15. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*. 2004 Feb 17;22(7):822–30.
16. Sobrinho AP, Barros MH, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias LM, Bambirra EA. Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *J Endod* . 1998;24(6):405–8.
17. Lee W, Lim Son H-H, Bae K-S. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* . 2004;30(4):209–12.
18. Jett D, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of Enterococci. *Clin Microbiol Rev* . 1994;7(4):462–78.
19. Alghamdi F, Shakir M. The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: a systematic review. *Cureus*. 2020 Mar 13;12(3).

20. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod* . 2004;30(4):218–9.
21. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):815–8.
22. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: a review. *J Int Soc Prev Community Dent* . 2015;5(1):1–12.
23. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(2):121–6.
24. Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* . 2012 Apr;45(4):311–6.
25. Jiménez-Rojas LF, Juárez MDP, Ferreira-Alves FR. Capacidad de penetración y difusión de la medicación intraconducto en túbulos dentinales, conductos laterales e istmos. Una revisión sistemática. *Int J Odontostomat*. 2021;15(3):727–33.
26. Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P. Root canal medicaments. *Int Dent J* [Internet]. 2009 Feb;59(1):5–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19323305>
27. Kumar A, Tamanna S, Iftekhhar H. Intracanal medicaments - Are their use advocated in modern endodontics: A narrative review. *J Oral Res Rev* . 2019;11:89–94.
28. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CR. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2009;17(1):1–7. Available from: [www.fob.usp.br/jaos](http://www.fob.usp.br/jaos)

29. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* . 1999 Sep;32(5):361–9.
30. Zubair M, Sadaf D, Merdad K, Almohaimeed A, Onakpoya I. Calcium hydroxide as an intracanal medication for postoperative pain during primary root canal therapy: A systematic review and meta-analysis. *J Evid Base Dent Pract*. 2022;
31. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J* . 2005;55(5):293–301.
32. Rodríguez Gutiérrez G, Álvarez Llanes M, García Boss J, Arias Herrera S, Sarabia M. El hidróxido de calcio: su uso clínico en la endodoncia actual. *AMC*. 2005;9(3):143–52.
33. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 25va ed. McGraw-Hill Medical; 2012.
34. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. Londres, Inglaterra: W B Saunders; 1998.
35. Voet D, Voet JG. Biochemistry. 4ta ed. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons; 2011.
36. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. Vol. 32, *Int Endod J* . 1999. p. 257–82.
37. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dental Traumatology*. 1985;1(5):170–5.
38. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2012 Jan;38(1):81–5.

39. Dinicola S, De Grazia S, Carlomagno G, Pintucci JP. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(19):2942–8.
40. Pei Y, Liu H, Yang Y, Yang Y, Jiao Y, Tay F, et al. Biological activities and potential oral applications of N-acetylcysteine: progress and prospects. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;1–14.
41. Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician* [Internet]. 2009;80(3). Available from: [www.aafp.org/afp](http://www.aafp.org/afp).
42. Heredia-Veloz D, Abad-Coronel D, Villavicencio-Caparó E. Eficacia antibacteriana de tres selladores endodónticos frente al *Enterococcus faecalis*. *Rev Estomatol Herediana*. 2017;27(3):132–40.
43. Lin Y, Mickel A, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2003;29(9):565–6.
44. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011;44(8):697–730.
45. Sjorgen U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *International Endodontic Journal* . 1991;24:119–25.
46. Estrela C, Pimenta C, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod*. 1999;25(6):416–8.
47. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2012 Jan;38(1):81–5.

48. Abdulrab S, Mostafa N, Al-Maweri S, Abada H, Halboub E, Alhadainy H. Antibacterial and anti-inflammatory efficacy of N-acetylcysteine in endodontic treatment: a scoping review. *BMC Oral Health*. 2022 Dec 1;22(1).