

[Escriba aquí]

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**Evaluación in vitro de la citotoxicidad de las nanopartículas de
quitosano como irrigante para el tratamiento de
conductos**

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

PRESENTA:

C.D. Daniel Alejandro Moya Pedraza

PRESIDENTE

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

SINODAL

DR. LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ

SINODAL

DR. ÁLVARO CRUZ GONZÁLEZ

SINODAL

M.C.S. LUIS HERNÁN CARRILLO VÁRGUEZ

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 25 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **Evaluación in vitro de la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano como irrigante para el tratamiento de conductos.**

Propuesto por el **C.D. Daniel Alejandro Moya Pedraza**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE



PRESIDENTE

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 25 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **Evaluación in vitro de la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano como irrigante para el tratamiento de conductos.**

Propuesto por el **C.D. Daniel Alejandro Moya Pedraza**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE

SINODAL
DR. LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 25 de junio de 2021

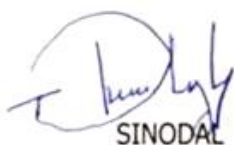
AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **Evaluación in vitro de la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano como irrigante para el tratamiento de conductos.**

Propuesto por el **C.D. Daniel Alejandro Moya Pedraza**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE



SINODAL

DR. ÁLVARO CRUZ GONZÁLEZ

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

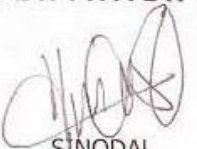
Tijuana, B.C. a 25 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **Evaluación in vitro de la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano como irrigante para el tratamiento de conductos.**

Propuesto por el **C.D. Daniel Alejandro Moya Pedraza**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE

SINODAL
M.C.S. LUIS HERNÁN CARRILLO VÁRGUEZ

Ccp.- Archivo.

Evaluación in vitro de la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano como irrigante para el tratamiento de conductos.

PRESENTA



C.D. Daniel Alejandro Moya Pedraza

PRESIDENTE



PRESIDENTE

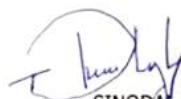
DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

SINODALES



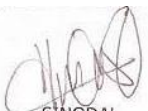
SINODAL

DR. LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ



SINODAL

DR. ÁLVARO CRUZ GONZÁLEZ



SINODAL

M.C.S. LUIS HERNÁN CARRILLO VÁRGUEZ

Tijuana, Baja California, 25 de junio de 2021

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	¡Error! Marcador no definido.
INDICE DE FIGURA.....	¡Error! Marcador no definido.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
I. RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
II. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 ENDODONCIA	3
2.2 MORFOLOGÍA RADICULAR	4
2.3 DESINFECCIÓN EN ENDODONCIA.....	5
2.3.1 Hipoclorito de sodio	6
2.3.2 Clorhexidina	6
2.3.3 EDTA (etilendiaminotetraacético)	7
2.3.4 MTAD	8
2.4 NANOTECNOLOGÍA EN ENDODONCIA.....	8
2.4.1 Nanopartículas en endodoncia.....	10
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
V. HIPÓTESIS	19
5.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO	19
5.2 HIPÓTESIS NULA.....	19
VI. OBJETIVOS.....	20
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
VII. VARIABLES	21
7.1 VARIABLE DEPENDIENTE.....	21
7.2 VARIABLE INDEPENDIENTE	21
7.3 OPERACIÓN DE VARIABLES	21
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
8.1 TIPO DE ESTUDIO	22
8.2 UNIVERSO DE ESTUDIO.....	22
8.3 MATERIALES E INSTRUMENTOS.....	22
8.4 METODOLOGÍA	23
8.4.1 Cultivo celular de fibroblastos L929	23

8.4.2 Inoculación de las nanopartículas	23
8.4.3 Ensayo MTT	24
8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
IX RESULTADOS.....	¡Error! Marcador no definido.
X. DISCUSIÓN	¡Error! Marcador no definido.
XI. CONCLUSIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
XII. RECOMENDACIONES	¡Error! Marcador no definido.
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXOS Y APÉNDICES	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE ABREVIATURAS

NaClO – Hipoclorito de sodio

EDTA - Etilendiamonotetraacético

NPs - Nanopartículas

ZnONP – Nanopartículas de óxido de zinc

CsNPs – Nanopartículas de quitosano

DMEM – Dulbecco Eagles minimal essential médium

I. INTRODUCCIÓN

1.1 ENDODONCIA

La endodoncia es la rama de la odontología encargada de estudiar y tratar la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental y tejidos perirradiculares (1).

La morfología del sistema de conductos radiculares y sus variaciones en los distintos dientes representan un gran reto para el odontólogo, estas características han sido señaladas por años en diversos estudios como una de las principales causas que obligan a la endodoncia a estar en constante cambio e implementación de nuevas técnicas e instrumentos que faciliten realizar el tratamiento de conductos. Al realizar el tratamiento de endodoncia se tiene como principal objetivo evitar que se pierda el diente en tratamiento y particularmente se espera una respuesta positiva a largo plazo por parte del dentista tratante, sin embargo, el tratamiento de conductos se lleva a cabo por odontólogos de práctica general y no solo por especialistas en endodoncia, factor relevante en el pronóstico, un aproximado de 49% de los odontólogos esperan que el diente permanezca en boca de 5 a 10 años después del tratamiento, sin embargo un 80% condenaba al diente a requerir un tratamiento adicional, como retratamiento no quirúrgico o cirugía apical para que esto fuera posible (2,3).

Además de las urgencias que requieren atención inmediata, la endodoncia es uno de los primeros tratamientos que se le plantea al paciente cuando se atiende de manera integral, procurar las alteraciones pulpares desde que son asintomáticas es muy importante para mejorar el pronóstico del diente, antes de que se presente una agudización u ocurra una infección que sea complicada de controlar, que haya afectado a los tejidos perirradiculares y sea más largo el proceso para erradicarla. Todo esto se toma en cuenta debido a la importancia que conlleva mantener tejidos radiculares y periodontales sanos antes de colocar cualquier tipo de restauración y evitar un fracaso de la misma (2).

Para que el tratamiento de conductos tenga un pronóstico favorable dependerá de múltiples factores, algunos pueden ser controlados y otros tantos no, el trabajo del operador en el sillón dental es consciente y basado en conocimientos previos que pueden ser controlados y que darán pauta para obtener éxito en el tratamiento. En 1958 Ingle señala que la piedra angular del éxito en el tratamiento de conductos está basada en el cumplimiento de la llamada Tríada endodóntica, compuesta por tres principios básicos: asepsia, preparación biomecánica y sellado apical (4)

1.2 MORFOLOGÍA RADICULAR

Conocer la morfología del sistema de conductos radicular es necesario previo a la introducción al estudio de la endodoncia, es importante desde que se inicia el diagnóstico hasta que se restaura el diente pasando por el tratamiento de conductos. La cavidad pulpar es el espacio que existe en el interior del diente rodeado por pared dentinaria en casi su totalidad, esta se extiende desde la corona anatómica del diente hasta la longitud completa de las raíces en donde actualmente se conoce que no es de forma simétrica, es un sistema muy complejo y contiene múltiples variaciones de diente a diente y paciente a paciente sin importar que la anatomía externa sea similar o se parezca a otros dientes (1).

La morfología, orificios y frecuencia de conductos accesorios se ha investigado en molares mandibulares en donde se han encontrado hasta 24 configuraciones diferentes de conductos radiculares en raíces mesiales y hasta 16 en raíces distales mostrando incluso de 1 a 4 forámenes apicales hasta en un 30%, por lo que comparando en diversos estudios, en la actualidad se deben tomar en cuenta las múltiples variaciones en las que se trabaja al realizar un tratamiento de conductos y recordando que es un sistema muy complejo, de mínimo tamaño y al que no podemos acceder si no es por medio de instrumentos, soluciones químicas y tecnología que actualmente facilita más el tratamiento y mejora el pronóstico del diente (5).

2.3 DESINFECCIÓN EN ENDODONCIA

En busca de brindar un tratamiento más efectivo en las últimas décadas del siglo anterior y principios de este se han hecho descubrimientos y creaciones que complementan la triada endodóntica, por años se ha fijado la atención en la instrumentación de los conductos, que incluye la conformación de manera que permita la irrigación, la desinfección con medicamentos y la obturación como paso final, sin embargo, la desinfección es el complemento indispensable para el control y la eliminación de la infección (6).

Los estudios actuales con las diferentes técnicas de instrumentación y utilizando diferentes sistemas manuales y rotatorios han demostrado que el trabajo mecánico no es suficiente para realizar la eliminación completa de las bacterias y a lo largo del tiempo se han implementado e investigado diversos agentes irrigantes que complementan la eliminación de la infección y la disolución del tejido, además de lubricar el conducto al momento de realizar la instrumentación (2).

El objetivo principal de la irrigación es eliminar las bacterias del biofilm que se encuentran localizadas en lugares donde no se puede acceder con los instrumentos biomecánicos debido a las complicaciones anatómicas, diversidad en los conductos y anatomía diversa. La presencia de estas bacterias en el complejo dentino pulpar son la principal causa de las lesiones perirradiculares (6).

Algunas de las soluciones utilizadas desde hace mucho tiempo son el suero estéril, el hipoclorito de sodio, la clorhexidina, el etilendiaminotetraacético, algunos detergentes, entre otros (2).

Desde hace muchos años se han estudiado diversos irrigantes, los más comúnmente utilizados en la década de los 80's eran el hipoclorito de sodio y la clorhexidina, los cuales eran comparados en múltiples estudios evaluando las características que cumplían cada uno para ser el mejor irrigante. El hipoclorito de sodio al 2.5% contra la clorhexidina al 0.2% obtenía un papel significativamente mayor en cuanto a eficacia como agente antimicrobiano, sobre todo cuando se trataba de estado pulpar necrótico e incluso se obtenía que la clorhexidina no tenía

un efecto bactericida más duradero que el del hipoclorito de sodio como se creía entonces (7).

2.3.1 Hipoclorito de sodio

El NaOCl es el irrigante actual con más propiedades deseables que existe y es utilizado actualmente. Se ha utilizado durante más de un siglo y sus inicios datan en la Primera Guerra Mundial donde se utilizaba para limpiar heridas y desinfectarlas. En endodoncia tiene un papel importante contra los microorganismos y el biofilm incluyendo al *Enterococcus faecalis*, que es el microorganismo más persistente en las patologías endodónticas. Otra de las características importantes y relevantes de este irrigante es que disuelve tejido orgánico como es el tejido pulpar y el colágeno. Durante el tratamiento de conductos este irrigante se utiliza a diferentes concentraciones que van de 0.5% a 6%. Se ha evaluado a diferentes concentraciones encontrando resultados de eliminación diversa dependiente de la concentración utilizada y la técnica de irrigación empleada (2). Sin embargo, existe una falta de acuerdo sobre la concentración a la que debe ser utilizado para obtener un resultado eficaz. Hay estudios en los que se han identificado niveles de reducción de bacterias diferentes cuando se ha utilizado a diferentes concentraciones como al 0.5% y al 3%, en otro estudio la diversidad bacteriana redujo significativamente utilizándolo al 2.5%, con diversos estudios este sigue siendo el irrigante más eficaz y utilizado actualmente, sin embargo, su inconveniente más grave es su potencial irritante de los tejidos periapicales, especialmente si se encuentra a altas concentraciones, lo que ha conllevado al estudio de diversos irrigantes que puedan sustituirlo superando sus características y que entre ellas no se encuentre la toxicidad a los tejidos periapicales (8).

2.3.2 Clorhexidina

La clorhexidina es un antimicrobiano efectivo contra bacterias gram – y gram +. Es uno de los irrigantes más utilizados en odontología, pero no precisamente en el tratamiento de conductos, desde hace muchos años se ha utilizado en terapia periodontal y como agente de limpieza en cavidades cariosas. Su uso como irrigante

en el tratamiento de conductos es justificado por su efecto antimicrobiano eficaz y de larga duración, sin embargo, sigue siendo inferior en cualidades al hipoclorito de sodio, sobre todo en su incapacidad para disolver tejido orgánico. Se ha utilizado en combinación con otros medicamentos y hoy en día solo se indica como irrigante para el lavado final por su cualidad para unirse a la dentina y mantener su capacidad antimicrobiana más tiempo, especialmente cuando se trata de un tratamiento previo que ha fracasado (2,8).

Está demostrado que la clorhexidina es un antiséptico eficiente, pero al no ofrecer ventajas superiores al hipoclorito de sodio como irrigante en endodoncia debe ser considerada una opción más entre las sustancias irrigantes (1).

2.3.3 EDTA (etilendiaminotetraacético)

Esta sustancia comenzó a utilizarse en endodoncia en 1957. Forma parte de los quelantes, que se encargan de atraer iones de calcio a lo largo de las paredes de los conductos del diente, lo que ayuda a evitar el bloqueo apical y permite una mejor instrumentación además de contribuir a la desinfección. Se encuentra al 17% y su irrigación está indicada durante la conformación del conducto y al finalizar la instrumentación de este, lo que permitirá que los materiales que se coloquen después, incluida la medicación intraconducto, tengan íntima relación con las paredes dentinarias.

Su principal uso se basa en la remoción del barrillo dentinario para crear superficies dentinarias limpias y obtener mejor permeabilidad en los conductos.

Al compararse en diversos estudios con el hipoclorito de sodio se encontró que es más eficaz en su capacidad antimicrobiana que el NaOCl al 0.5% pero más débil cuando este se trataba a una concentración del 2.5% que es la más utilizada en el tratamiento de conductos, posicionándose como otro de los irrigantes que no superan las capacidades antimicrobianas del NaOCl (2,1).

Se ha evaluado también si la irrigación con EDTA tiene efectos adversos o favorables en terapias endodónticas regenerativas que interrumpan la terapia o la

afecten a tal grado de impedir la regeneración de los tejidos como en el caso de la revascularización, lo que supone y sugiere que el uso del EDTA es común en la terapia endodóntica, sin embargo, se debe valorar y controlar su uso en cada paciente para que sea positivo en el tratamiento de conductos (9).

2.3.4 MTAD

Esta solución irrigante es una mezcla de doxiciclina, ácido cítrico y detergente. Es una solución basada en antibiótico que se creó con el objetivo de obtener capacidad antimicrobiana como muchas otras, sin embargo, ha sido objeto de señalizaciones debido a su baja capacidad para erradicar bacterias por contacto. Se ha comparado en múltiples estudios con el NaCOI sin obtener éxito en su capacidad bactericida, pero si se ha demostrado la capacidad del ácido cítrico para eliminar el barrillo dentinario, lo que posiciona a esta solución como una opción más en los irrigantes a utilizar en el tratamiento de conductos (2).

2.4 NANOTECNOLOGÍA EN ENDODONCIA

En endodoncia, como en otras ramas de la odontología se ha implementado la tecnología para mejorar los diagnósticos y tratamientos además de brindar un mejor pronóstico de los dientes a tratar. La nanotecnología está ligada cada vez más en este campo debido a que se trata de espacios no visibles y muy pequeños como los que encontramos en el sistema de conductos radiculares y esto ha tenido un impacto favorable lo que ocasiona que se motive cada vez más en su investigación. Implementar nanotecnología en algunos materiales afecta significativamente sus propiedades físicas, químicas y por lo tanto mecánicas (10).

El papel de los microorganismos como principal causa de la periodontitis apical ha sido bien establecido, es por eso que los esfuerzos en la creación de nuevas terapias, instrumentos e implementación de nuevos materiales están dirigidos a erradicar directamente estos microorganismos para obtener éxito en la endodoncia (11).

Aunque el uso de los irrigantes químicos como la clorhexidina y el hipoclorito de sodio, el más utilizado, tienen un objetivo claro, aún tienen capacidad limitada para la eliminación completa del biofilm. Los avances en la nanotecnología están brindando gran oportunidad para la eliminación de las bacterias más resistentes, interrumpir el biofilm y controlar las infecciones que este provoca. Se han estudiado y sintetizado gran diversidad de nanopartículas con actividad antimicrobiana como las NPs de plata o de quitosano, un polímero natural (11).

Químicamente las NPs son muy diversas y una de las invenciones que ha generado interés dentro de los nanomateriales es la implementación de las NPs de plata en diversas áreas, en las que se incluye la odontología. Estas nanopartículas han sido ampliamente utilizadas para tratamiento antimicrobiano, sin embargo, uno de los factores que sigue preocupando y del cual se sigue buscando estandarizar el control es la concentración a la que se utilizan, debido a que a altas concentraciones son tóxicas. La evidencia ha indicado un gran resultado, pero también un gran daño si no se utilizan adecuadamente. En un estudio se analizaron en comparación con el NaClO en el tejido conectivo de ratas en dientes y obtuvieron como resultado que al activar estas partículas eliminaba significativamente al *E. faecalis* en la superficie de los conductos y a diferentes profundidades. Concluyen que pueden ser implementadas con un enfoque terapéutico para la desinfección en endodoncia, sin embargo, su eficacia debe evaluarse más teniendo otros tipos de control para establecer nuevos resultados (12).

Se ha buscado implementar este tipo de nanopartículas como irrigante de conductos en endodoncia, pero como la mayoría de los estudios sobre irrigación, este es comparado con las cualidades que posee el hipoclorito de sodio. Sin embargo, una de sus características no deseadas es compartida con el NaClO: su toxicidad. Se han observado reacciones alérgicas en pacientes expuestos al nitrato de plata además de toxicidad hepática y renal. Incluso se ha descubierto que la toxicidad es general en las NPs aunque sean de diferentes materiales. Evaluándolas en los mismos estándares que el NaClO se observan respuestas tisulares inflamatorias crónicas moderadas al inicio con una reducción al tiempo (12,13).

Por lo general en el estudio de las NPs se realizan comparaciones entre diferentes materiales o del mismo, pero a distintas concentraciones o sintetizadas a diferente tamaño. Por ejemplo, se han estudiado diferentes tipos de nanopartículas de plata en la línea celular de fibroblastos de ratón L929 y su reacción en el tejido conectivo, en el que se encontraron que dependiendo el tiempo y la concentración podían llegar a ser significativamente tóxicos e interrumpir la respuesta normal inmune del tejido. Concluyeron que, si se utilizan a bajas concentraciones y bien controladas no tendrían ninguna repercusión en los tejidos, sin embargo, se necesitan más estudios para asegurarlo (14).

2.4.1 Nanopartículas en endodoncia

Debido a la gran complejidad que representa en la cavidad oral la flora bacteriana y la interacción que tiene con las diferentes patologías bucodentales, actualmente se requieren materiales que ayuden a combatir la etiología de los diferentes padecimientos. Durante los últimos años han sido evaluadas mediante diversas pruebas los diferentes tipos de nanopartículas que atraen principalmente por su alta capacidad antimicrobiana y porque son de tamaño nanométrico, el cual es un factor muy importante cuando se trata del sistema de conductos radicular, un sistema complejo e invisible a simple vista (15).

La limpieza y desinfección en el tratamiento de conductos es particularmente difícil por tratarse de espacios nanométricos en donde se encuentra el biofilm y no podemos acceder con los instrumentos que hoy en día tenemos, por lo que las nanopartículas representan una opción viable. Existen estudios que comprueban que las nanopartículas de plata en conjunción con alcohol vinílico y farnesol obtuvieron eficacia antimicrobiana y menos citotoxicidad que el hipoclorito de sodio al 2.5% (16).

La nanotecnología permite disminuir el tamaño y forma de las nanopartículas pero aumentar su resistencia y conservar o modificar su eficacia. Los estudios revelan aportaciones en odontología desde la prevención hasta el tratamiento. En 2017 Ibrahim y cols. Hicieron una revisión del efecto antibacteriano de NPs de diferentes

materiales utilizados en endodoncia donde el quitosano fue uno de los materiales elegidos por su alta capacidad antibacteriana (17).

Aunque los principales irrigantes y los más utilizados siguen teniendo buenas características son incapaces aún de erradicar por completo la infección bacteriana debido a la incapacidad de poder transportarlos a lugares nanométricos del sistema de conductos, no pueden acceder por completo a los túbulos dentinarios. Las nanopartículas están brindando oportunidades prometedoras para poder complementar e incluso superar a los irrigantes actuales en un futuro no muy lejano. Aun cuando son prometedoras el principal problema es el tiempo de contacto prolongado que se requiere y su toxicidad a concentraciones no controladas (11).

Las nanopartículas metálicas proporcionan ventaja antimicrobiana especialmente contra el biofilm cuando se trata una infección en el sistema de conductos. Los selladores forman parte importante de la obturación y una de las cualidades que poseen algunos es su capacidad antibacteriana también, es por eso que se ha evaluado también su eficacia en conjunto con algunas nanopartículas, las ZnONp (nanopartículas de óxido de zinc) junto con el sellador de Grossman a diferentes concentraciones y en diferentes cantidades, además de potencializar su capacidad antibiofilm, se buscaba obtener una mejor consistencia en la mezcla del cemento, que no afectará sus propiedades y que las mejorara. Las ZnONp disminuyeron el tiempo de fraguado y mejoraron los cambios dimensionales del sellador potencializando sus propiedades (18).

Otras nanopartículas evaluadas en la actualidad son las de óxido de hierro, que se utilizan en la medicina como agentes de contraste en la resonancia magnética debido a su biocompatibilidad. Se ha demostrado que estas NPs tienen potentes propiedades antibiofilm sin efectos nocivos, donde se evaluaron los túbulos dentinarios después de ser sometidos a irrigación con estas NPs y podían apreciarse limpios y sin obstrucciones. En los resultados se mostraba la unión de las NPs a la superficie bacteriana que indicaba viabilidad para utilizarlas en el tratamiento de endodoncia (11).

2.4.1.1 Nanopartículas de quitosano

Actualmente en múltiples estudios se han evaluado diferentes tipos de nanopartículas prometedoras para la implementación como irrigante en endodoncia, algunas de estas en combinación con otros materiales que potencializan su eficacia y mejoran sus cualidades. El quitosano es uno de esos materiales que proveen a las nanopartículas características específicas que prometen superar a algunos otros (18).

El quitosano es un polímero natural proveniente de la quitina, es el segundo material más abundante en la Tierra. Es un componente de las paredes de los crustáceos. Su descubrimiento data del año 1811 por Henri Braconnot, sin embargo, no fue hasta 1894 que se introduce el nombre de quitosano por Félix Hopper-Seyler. Es un material que posee distintas propiedades que lo hace versátil debido a la distribución regular y uniforme que tiene en sus enlaces químicos, es una estructura rígida que le confiere estabilidad térmica para lograr mayor actividad biológica (19).

La quitina pasa por un proceso de desmineralización, desproteínización y desacetilación para obtener el quitosano. Estos procesos le ofrecen al quitosano cualidades que lo hacen funcional y muy versátil, principalmente su actividad antifúngica y antibacteriana, que son las dos más importantes en el campo de la medicina y ahora la odontología (20).

Las nanopartículas de quitosano podrían sintetizarse e implementarse utilizando diferentes métodos según cual sea el objetivo y su aplicación. Este material ha recibido gran exposición por su capacidad de implementarse en distintas formas sin perder sus capacidades más importantes, lo podemos encontrar en nanopartículas, cápsulas, polvo, geles, andamios, entre otras. Tiene una estructura similar al de la matriz extracelular y por eso es muy requerido para las construcciones de colágeno (15).

El mecanismo que se describe en la acción de este polímero en las bacterias es por contacto, se basa en la unión de las nanopartículas a secciones de la membrana de las bacterias que están cargadas negativamente. En consecuencia, las

nanopartículas alteran la estructura de las células, las rompen y causan fugas hacia el citoplasma, que es por donde penetran, interactúan con el ADN Y ARN y destruyen, muchas veces por completo la célula bacteriana (15).

Hoy en día se reconoce al biofilm como uno de los factores más complicados a eliminar en el tratamiento de conductos. Se ha descrito que las NPs de quitosano como las de óxido de zinc poseen propiedades antibacterianas que ayudan a la eliminación del biofilm evaluando la eficacia del efecto de ambas NPs a largo plazo incluso después de su envejecimiento. La tasa de destrucción bacteriana depende de la concentración de las NPs y el tiempo en que están en contacto con las bacterias. Existe una reducción significativa en el grosor del biofilm incluso después del envejecimiento de las nanopartículas (18).

Además de su gran capacidad antibacteriana también se han estudiado diferentes propiedades de las NPs de quitosano y de óxido de zinc. Se han evaluado en distintas formas y en combinación con otros materiales. La combinación de ambos materiales para crear una sola nanopartícula puede traer diferentes cualidades o potencializar las ya presentes. Se ha evaluado la combinación de NPs de quitosano con óxido de zinc, ambas por separado y nanopartículas de óxido de zinc con recubrimiento multicapa de quitosano, sin embargo, también se ha evaluado su interacción con selladores a base de óxido de zinc. Se ha demostrado que las nanopartículas de quitosano no alteran sus características y además potencializan su capacidad antibacteriana directa contra la adherencia a *E. faecalis* (21).

Debido a las características favorables de las NPs de quitosano se han evaluado también en comparación con otros materiales que prometen tener grandes características también, se ha puesto a prueba la eficacia de estas y del extracto de propóleo etanólico incorporado en una pasta de hidróxido de calcio para destruir el biofilm. La mayoría de los estudios se basan en la destrucción de *E. faecalis*, ya que es el microorganismo más persistente en el biofilm en el tratamiento de conductos. Se ha identificado que en conjunto con la pasta de hidróxido de calcio se logra una gran reducción del biofilm y es bastante eficaz la colocación de las NPs de quitosano

para destruir bacterias durante los primeros 7 días e incluso a largo plazo, después de su envejecimiento (22).

Los protocolos e irrigantes actuales tienen un gran problema, y es que a pesar de ser muy eficaces no logran inactivar las endotoxinas de las bacterias en las infecciones radiculares. Las nanopartículas de quitosano (CSNPs) han sido evaluadas en conjunción con nanopartículas de rosa de bengala (CSRBnps) para inactivar selectivamente las endotoxinas a través de marcadores, evaluando además agentes antimicrobianos como el Ca(OH)_2 , CSNPs y azul de metileno. Se evaluaron directamente en macrófagos para determinar la citotoxicidad a través de la actividad mitocondrial principalmente. La conjunción de CSRBnps fueron completamente no citotóxicos, por lo que causaron la inactivación de las endotoxinas y reducción de marcadores inflamatorios. Por su gran versatilidad el quitosano se está posicionando como un gran material capaz de tener respuesta favorable y potencializarla al mezclarla con otro tipo de materiales y en la diversidad estudiada hasta ahora se ha obtenido buena respuesta, sin embargo, falta estudiarlo más para implementarlo en diversas áreas (23).

Los selladores son parte importante del proceso en el tratamiento de conductos, la obturación es el paso final de la endodoncia, es donde culmina todo el proceso y en el que debemos preservar todo lo antes realizado. Agregar nanopartículas a los selladores tiene como objetivo mejorar sus características, sin embargo, aún no es claro el proceso y el resultado de la implementación de estas en los selladores. En diversos estudios se evalúa la capacidad antibacteriana de muchos materiales en endodoncia contra el *E. faecalis*. La combinación de nanopartículas de quitosano con clorhexidina ha mostrado hasta un 55% más efectividad y capacidad antimicrobiana. El mezclar CSNPs-Chx con selladores como AH plus y Tubliseal podrían utilizarse para el control de la infección endodóntica. Todos los selladores tienen buenas propiedades antibacterianas, sin embargo, su eficacia mejoró agregándole CSNPs (24).

Agregar CSNPs a un sellador además de potencializar su capacidad antimicrobiana también ha potencializado su capacidad de penetración en los túbulos dentinarios,

sin embargo, esta característica no es la cualidad principal de las CsNPs y al momento de obtener resultados otras sustancias, como el EDTA por sí solo, son capaces de lograr una mejor permeabilidad que la realizada por las nanopartículas de quitosano. Se recomienda el uso de las CsNPs como irrigante de conductos, sin embargo, aún hay pocos estudios y la evaluación en cuanto a penetración del sellador implementándolas está más atrasada (25).

El efecto sinérgico que tienen las CsNPs con otros medicamentos o nanopartículas es objeto de estudio además de su potencial antimicrobiano. Su capacidad antifúngica no se debe dejar pasar, ya que es otra de sus características importantes y está demostrado que son altamente activas contra *Candida albicans*. Una sinergia bien elegida es con las nanopartículas de aceite de oliva osonizadas, en donde se muestra que son hasta ocho veces más potentes contra el *E. faecalis* y *Streptococcus mutans*. Por lo tanto, la sinergia con algunas otras NPs puede llegar a ser exitosa para erradicar biofilm maduro, de diferentes especies y actuar de manera más potente y segura (26).

Para la evaluación de las CsNPs es importante el tipo de estudio en que se miden, ya que se ha demostrado que el desarrollo del biofilm se desarrolla de forma diferente en un entorno natural a la formada en un ambiente in vitro. La recontaminación del sistema de conductos es un indicador de que el paciente necesita un retratamiento, y comúnmente nos enfrentamos a estos tratamientos en donde han pasado años y ya existe una recontaminación y recolonización bacteriana. Tanto el EDTA como el NaCOI son buenos irrigantes y tienen sus consideraciones. El tratamiento únicamente con estos irrigantes por separado no nos puede asegurar una completa desinfección. Pero si se unen las CsNPs a estos dos irrigantes comunes, el resultado es la interferencia del quitosano con la adhesión bacteriana (27).

En otros estudios se ha evaluado la capacidad de formación de biofilm dentro de la interfaz dentina-sellador utilizando selladores con CsNPs en donde se demuestra que su capacidad antibacteriana además de inhibidora es completamente funcional (11).

El quitosano está cobrando gran fuerza en el área de la endodoncia, al ser un material tan versátil es que se puede evaluar en diferentes formas y con diferentes materiales en conjunción, con otro tipo de nanopartículas y con otro tipo de técnicas. Se pretende en un futuro evaluar más estos métodos para crear una presentación ideal de las CSNPs e implementarlas en el mercado y al alcance de todos los odontólogos (24).

II. JUSTIFICACIÓN

Las nanopartículas de quitosano han sido implementadas en distintas áreas en donde su eficacia va en ascenso. Debido a la versatilidad de este polímero y a las cualidades que tiene al ser sintetizado en nanopartículas: su tamaño, gran área de superficie, pero sobre todo capacidad antibacteriana, se pretende evaluar su citotoxicidad con el objetivo de superar las cualidades que nos ofrece actualmente el hipoclorito de sodio y tener otra opción a elegir como solución irrigante en el tratamiento de conductos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La irrigación en endodoncia es el paso más importante en el tratamiento de conductos en donde el hipoclorito de sodio es el irrigante más utilizado actualmente, sin embargo, no cumple con todos los estándares que lo hagan la solución ideal, su principal problema es su grado de toxicidad. Por esto resulta de gran importancia la investigación para la futura implementación de una solución que mejore y potencialice las características de un irrigante ideal aprovechando la nanotecnología por tratarse del complejo sistema de conductos radicular.

IV. HIPÓTESIS

5.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las nanopartículas de quitosano presentan un nivel de viabilidad celular del 100 a 75 % (ISO 10993) para fibroblastos L929, son no citotóxicas y pueden ser implementadas como irrigante en el tratamiento de conductos.

5.2 HIPÓTESIS NULA

Las nanopartículas de quitosano presentan un nivel de viabilidad celular por debajo del 50% (ISO 10993) para fibroblastos L929, son ligeramente citotóxicas y deben evaluarse nuevamente para verificar si pueden ser implementadas como irrigante para el tratamiento de conductos.

V. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano al 0.1% mediante el ensayo MTT.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar las nanopartículas de quitosano, mediante el método de gelación iónica.
2. Caracterizar las nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular mediante dispersión de luz dinámica, para verificar su tamaño, dispersión de tamaño y potencial Zeta.
3. Evaluar in vitro la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano al 0.1% en fibroblastos L929 mediante el método MTT.

VII. VARIABLES

7.1 VARIABLE DEPENDIENTE

Porcentaje de viabilidad celular para fibroblastos L929.

7.2 VARIABLE INDEPENDIENTE

Concentración de solución de nanopartículas de quitosano.

7.3 OPERACIÓN DE VARIABLES

Se determinará la viabilidad celular de fibroblastos L929 para evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano a través de la prueba MTT basada en la reducción del bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico. El nivel de citotoxicidad será medido con base en la clasificación de citotoxicidad para la viabilidad celular por la norma ISO 10993.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 TIPO DE ESTUDIO

Este tipo de estudio es correlacional debido a que se pretende evaluar el comportamiento de las nanopartículas de quitosano sobre fibroblastos L929 relacionando la cantidad de formazan formado con la proliferación y supervivencia celular (28).

8.2 UNIVERSO DE ESTUDIO

Los extractos preparados adecuadamente se colocaron en los pocillos de la placa de predilución (placa de 96 pocillos) de acuerdo con el protocolo para la distribución de muestras de prueba. Muy a menudo, tres extractos en distribución horizontal en un número adecuado de dilución – 10, se prueban en una microplaca. Las filas más altas y bajas constituyen una barrera celular y la primera columna se deja libre como un valor cero para el lector. Las células liberadas (fibroblastos L929) llevadas al estado de suspensión con una indicación precisa de su cantidad se agregan a la segunda placa (placa de prueba) (29,30).

8.3 MATERIALES E INSTRUMENTOS

Se realizó un conteo celular de fibroblastos L929 previamente cultivados en DMEM (GIBCO, Grand Island, NY) en el laboratorio y la cuantificación por medio de la cámara de Neubauer (Marienfeld Superior, Alemania). Se procedió a realizar la inoculación de las nanopartículas una vez determinada su concentración por medio de una balanza analítica (Eppendorf, Alemania). Se preparó el reactivo sal de MTT y se agregó a los pocillos de la placa de 98 pocillos. Posterior a esto se mantiene en observación bajo el microscopio para observar la cantidad de formazan producido y medir la absorbancia en un lector de placas (Synergy HT, Bio-Tek, USA) para verificar la proliferación y supervivencia celular de los fibroblastos.

8.4 METODOLOGÍA

8.4.1 Cultivo celular de fibroblastos L929

Para el cultivo celular se realizó el descongelado de los fibroblastos introduciendo los contenedores que se encontraban a -80 °C en agua destilada a 37 °C para introducirlos después en un microtubo hasta terminar su descongelado. Después fueron incubados a 37 °C con 5% CO₂ durante 24 horas. Los fibroblastos fueron cultivados y colocados en botellas de cultivo de 75 cm² (Corning, Inc., NY) hasta tener un 80% mínimo de confluencia para posteriormente subcultivarlos.

8.4.1.1 Subcultivo celular

Para realizar el subcultivo los fibroblastos se despegaron de las botellas de cultivo agregándoles 0.05% de tripsina/EDTA (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY) y fue centrifugada por 3 minutos a 1,500 rpm. Del sobrante fue desechado y el pellet celular fue resuspendido en un medio fresco de 5 mL. Posteriormente se realizó el conteo celular utilizando la cámara de Neubauer (Marienfeld Superior, Alemania).

8.4.2 Inoculación de las nanopartículas

Las nanopartículas dispuestas en polvo como vehículo para su inoculación, se redispersaron en DMEM (GIBCO, Grand Island, NY) y se inocularon a diferentes concentraciones para un ensayo de dosis-respuesta. Dispuestas en una placa con 96 pocillos se agregó a la columna 12 100 µL de medio de cultivo más 100 µL de NPs dándonos un total de 200 µL. Después se tomaron 100 µL y se pipeteó en 3 ocasiones para lograr una distribución homogénea. Después se agregaron 100 µL a la columna 11 y se pipeteó en 3 ocasiones. Se realizó el mismo paso hasta llegar a la columna 2, puesto que a la columna 1 no se le agregaron NPs ya que correspondió al grupo control de 100% células viables. Por último, se realizó una incubación durante 24 h a 37 °C con 5% de CO₂.

8.4.3 Ensayo MTT

El potencial citotóxico de las NPs fue evaluado con base en la norma ISO 10993-5:2009 (Organización Internacional de Estandarización) usando el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

Se prepararon 0.2 mg/mL de sal de MTT disuelto en DMEM suplementado y la sal MTT se disolvió por medio de agitación hasta observar el reactivo disuelto por completo. Posteriormente el medio de cultivo es aspirado con ayuda de una micropipeta. Después de agregar 100 µL de MTT a cada pocillo de los 96 previamente dispuestos en la placa y se dejaron incubar de 4-7 h a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad.

Mientras se cumplía el tiempo de incubación de los pocillos se supervisó a través del microscopio la formación de cristales de formazán hasta formarse un precipitado de color morado para posteriormente disolverlo en el medio de cultivo al eliminar la sal MTT agregando 100 µL de isopropanol (TECSIQUIM, TSQ, Iztacalco, Ciudad de México) a cada pozo. Y se agregaron 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). La placa con 96 pocillo se introdujo en un lector de microplaca (Synergy HT, Bio-Tek. Vermont, USA) con agitación por 10 segundos y después se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm.

La prueba se realizó en tres ocasiones para obtener resultados más exactos y lo más estandarizados posible.

8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez que se obtuvieron las lecturas de absorbancia se procedió a calcular la viabilidad celular a través de una fórmula:

Concentración = Número de células / Volumen en mL (1)

Se calculó el promedio y la desviación estándar al igual que se identificó el nivel de citotoxicidad con base en la norma ISO 10993 donde se destacan los porcentajes de viabilidad celular:

100-75%: No citotóxico

74-50%: Ligeramente citotóxico

49-25% Moderadamente citotóxico

24-0%: Extremadamente citotóxico

En caso de que las NPs reduzcan por debajo del 50% se calculará la concentración citotóxica media (CC50)

Los datos fueron analizados con pruebas de Shapiro–Wilk, pruebas paramétricas y en caso de ser necesario con pruebas no paramétricas.

Las pruebas deben realizarse 3 veces para tener comparación con el grupo control y poder comparar y graficar. Cuando se obtienen las lecturas fotométricas se calculan desviaciones estándar y porcentajes. De cada triplicado se realizará un comparativo entre la dosis de manera pareada para obtener valor de p y determinar si hay diferencias significativas o no.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldberg ISF. Endodoncia, Técnica y Fundamentos. 1a edición. Panamericana M, editor. Argentina; 2002. 03–316 p.
2. kenneth M. Hargreaves SC. Cohen vias de la pulpa. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2013. 1689–1699 p.
3. Rotstein I, Salehrabi R, Forrest JL. Endodontic Treatment Outcome : Survey of Oral Health Care Professionals. J Endod. 2006;32(5):399–403.
4. Ingle, J. Beveridge E. Endodoncia. In: Endodoncia. Editorial. México; 1979.
5. Wolf TG, Paqué F, Zeller M, Willershausen B, Briseño-Marroquín B. Root canal morphology and configuration of 118 mandibular first molars by means of micro-computed tomography: An ex vivo study. J Endod. 2016;42(4):610–4.
6. Bayardo González RA, Velázquez Jiménez YC, Acero Vargas KB. Principios básicos en Endodoncia Clínica [Internet]. 2018. 111–117 p. Available from: <http://repositorio.cualtos.udg.mx:8080/jspui/handle/123456789/828>
7. Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. J Endod. 1982;8(5):200–4.
8. Gonçalves LS, Rodrigues RCV, Andrade Junior CV, Soares RG, Vettore MV. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine as irrigant solutions for root canal disinfection: A systematic review of clinical trials. J Endod. 2016;42(4):527–32.
9. Taweewattanapaisan P, Jantararat J, Ounjai P, Janebodin K. The Effects of EDTA on Blood Clot in Regenerative Endodontic Procedures. J Endod [Internet]. 2019;45(3):281–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.10.010>

10. Akbarianrad N, Mohammadian F, Nazari AA, Nobar R. Applications of nanotechnology in endodontic: A Review. *Nanomed J*. 2018;5(3):121–6.
11. Bukhari S, Kim D, Liu Y, Karabucak B, Koo H. Novel Endodontic Disinfection Approach Using Catalytic Nanoparticles. *J Endod* [Internet]. 2018;44(5):806–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.12.003>
12. Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, Angelo Cintra LT, Tendoro KV, Dalto LG, et al. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *J Endod*. 2010;36(10):1698–702.
13. Dunn K, Edwards-Jones V. The role of Acticoat™ with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns*. 2004;30(SUPPL. 1).
14. Takamiya AS, Monteiro DR, Bernabé DG, Gorup LF, Camargo ER, Gomes-Filho JE, et al. In Vitro and in Vivo Toxicity Evaluation of Colloidal Silver Nanoparticles Used in Endodontic Treatments. *J Endod*. 2016;42(6):953–60.
15. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod*. 2016;42(10):1417–26.
16. Song W GS. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules*. 2019;24:1–15.
17. Ibrahim AIO, Moodley DS, Petrik L, Patel N. Nanoparticles in Endodontics. *sada*. 2017;72(3):105–12.
18. Shrestha A, Zhilong S, Gee NK, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod* [Internet]. 2010;36(6):1030–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.02.008>
19. Rodríguez-Pedroso AT, Ramírez-Arrebato MA, Rivero-González D, Bosquez-Molina E, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S. Propiedades Químico-Estructurales Y Actividad Biológica De La Quitosana. *Rev Chapingo Ser*

Hortic. 2009;15(3):307–17.

20. XIAO FEI LIU, YUN LIN GUAN, DONG ZHI YANG, ZHI LI KDY. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. *Inst Polym Mater*. 2001;
21. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An Investigation on the Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of Cationic Nanoparticulates for Root Canal Disinfection. *J Endod* [Internet]. 2008;34(12):1515–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.08.035>
22. del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, Bhagirath AY, Medapati MR, Lai C, et al. Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. *J Endod* [Internet]. 2017;43(8):1332–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.017>
23. Shrestha A, Cordova M, Kishen A. Photoactivated Polycationic Bioactive Chitosan Nanoparticles Inactivate Bacterial Endotoxins. *J Endod* [Internet]. 2015;41(5):686–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.12.007>
24. Loyola-Rodríguez JP, Torres-Méndez F, Espinosa-Cristobal LF, García-Cortes JO, Loyola-Leyva A, González FJ, et al. Antimicrobial activity of endodontic sealers and medications containing chitosan and silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2019;17(3).
25. Aydın ZU, Özyürek T, Keskin B, Baran T. Effect of chitosan nanoparticle, QMix, and EDTA on TotalFill BC sealers' dentinal tubule penetration: a confocal laser scanning microscopy study. *Odontology* [Internet]. 2019;107(1):64–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10266-018-0359-0>
26. Elshinawy MI, Al-Madboly LA, Ghoneim WM, El-Deeb NM. Synergistic Effect

of Newly Introduced Root Canal Medicaments; Ozonated Olive Oil and Chitosan Nanoparticles, Against Persistent Endodontic Pathogens. *Front Microbiol.* 2018;9(July).

27. del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MAH, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod.* 2015;40(3):195.
28. Vásquez I. Tipos de estudio y métodos de investigación. *Gestiopolis* [Internet]. 2016;1–12. Available from: <https://nodo.ugto.mx/wp-content/uploads/2016/05/Tipos-de-estudio-y-métodos-de-investigación.pdf>
29. AU L. The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Folia Biol Oecologica.* 2018;32:23–32.
30. Type A, Collection C. MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide. In Manassas. :1–6.