

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

PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CITOCOMPATIBILIDAD 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. CRISTINA MAGAÑA DELGADO

PRESIDENTE

DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ

SINODAL

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

SINODAL

DR. MANUEL ALATORRE MEDA

SINODAL

DRA. MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES HOFMANN SALCEDO

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA; MÉXICO

AGOSTO 2021

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 21 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO**

Propuesto por la **C.D. CRISTINA MAGAÑA DELGADO**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE



Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

PRESIDENTE

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 21 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO**

Propuesto por la **C.D. CRISTINA MAGAÑA DELGADO**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE



Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez

SINODAL

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 21 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO**

Propuesto por la **C.D. CRISTINA MAGAÑA DELGADO**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE


Dr. Manuel Alatorre Meda
SINODAL

Ccp.- Archivo

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a 21 de junio de 2021

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO**

Propuesto por la **C.D. CRISTINA MAGAÑA DELGADO**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE



Dra. María Elena de los Ángeles Hofmann Salcedo

SINODAL

Ccp.- Archivo.

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CITOCOMPATIBILIDAD DE
MEZCLAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO:N-
ACETILCISTEÍNA EMPLEADAS COMO MEDICACIÓN
INTRACONDUCTO**

PRESENTA

C.D. CRISTINA MAGAÑA DELGADO

PRESIDENTE

DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ

SINODALES

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO
VÁRGUEZ

DR. MANUEL ALATORRE MEDA

DRA. MARÍA ELENA DE LOS ÁNGELES HOFMANN SALCEDO

Tijuana, Baja California, 28 de junio de 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi formación profesional, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Agradezco a mi familia, por apoyarme desmedidamente aún cuando mis ánimos decaían. En especial, quiero mencionar a mis padres, por ser los principales promotores de mis sueños y metas los cuales siempre han estado incondicionalmente en todo momento para darme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para renovar energías.

De igual manera, agradezco a mi directora del proyecto la Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez quien fue un pilar durante todo este camino de la investigación, agradezco su paciencia, sus conocimientos y apoyo incondicional que me guiaron a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados obtenidos. Del mismo modo agradezco a mis sinodales del proyecto a la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez, al Dr. Manuel Alatorre Meda y la Dra. María Elena de los Ángeles Hofmann Salcedo por sus enseñanzas, ideas y conocimientos compartidos para la elaboración de este proyecto.

Finalmente quiero agradecer a mis docentes, personas de gran sabiduría quienes se han esforzado por ayudarme a llegar a culminar mi desarrollo profesional. Principalmente agradezco a la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez por permitirme ser parte como alumna de la generación 29 de la especialidad en Endodoncia.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer a las siguientes instituciones:

Inicialmente, agradezco a mi alma mater 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.

A CONACyT por la beca otorgada, No. CVU: 1004233.

A los miembros del Laboratorio de Cultivo Celular y Microscopia Confocal del Instituto Tecnológico de Tijuana, por recibirnos en su Institución y apoyarnos en la realización de la experimentación de este proyecto de investigación.

Finalmente, se agradece a los siguientes proyectos:

Proyecto de CONACyT: INFR-2015-251863 “Fortalecimiento de la infraestructura científica de un laboratorio de cultivo celular para el desarrollo y evaluación biológica de biomateriales poliméricos y nuevas nanoplataformas teragnósticas”. Responsable: Dr. Manuel Alatorre Meda.

Proyecto de CONACyT: PDCPN-2015-89 “Biomateriales producidos a partir de polímeros naturales para tratamiento regenerativo de úlceras del pie diabético”. Responsable: Dr. Manuel Alatorre Meda.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. ENDODONCIA.....	3
2.2. DESINFECCIÓN DEL CONDUCTO RADICULAR (ASEPSIA)	3
2.3. TIPOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS	5
2.3.1. Infección extrarradicular	5
2.3.2. Infección intrarradicular	5
2.3.2.1. Infección Primaria.....	5
2.3.2.2. Infección Secundaria	5
2.3.2.3. Infección persistente.....	6
2.4. DIVERSIDAD BACTERIANA DE INFECCIONES PERSISTENTES.....	7
2.4.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	8
2.4.1.1. Prevalencia en infecciones endodónticas persistentes	8
2.4.1.2. Patogenicidad.....	8
2.4.1.3. Morfología y características.....	9

2.4.1.4. Factores de virulencia	9
2.5. MEDICACIÓN INTRACONDUCTO	11
2.5.1. Propiedades de un medicamento intraconducto	11
2.5.1.1. Citocompatibilidad de un medicamento intraconducto	12
2.5.2. Indicaciones de una medicación intraconducto	12
2.6. HIDRÓXIDO DE CALCIO	13
2.6.1. Características químicas	13
2.6.2. Mecanismos de actividad antimicrobiana del $\text{Ca}(\text{OH})_2$	14
2.6.2.1. Daño a la membrana citoplasmática bacteriana.....	14
2.6.2.2. Desnaturalización de proteínas	15
2.6.2.3. Daño al ADN.....	15
2.6.3. Preparación de pasta de hidróxido de calcio como medicación intraconducto	15
2.6.4. Limitaciones del hidróxido de calcio como medicación intraconducto	17
2.7. ASOCIACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS CON HIDRÓXIDO DE CALCIO.....	19
2.7.1. Paramonoclorofenol alcanforado	19
2.7.1.1. Características.....	19
2.7.1.2. Limitaciones de citocompatibilidad en asociación con $\text{Ca}(\text{OH})_2$	19
2.7.2. Clorhexidina.....	19
2.7.2.1. Características químicas	20
2.7.2.2. Mecanismo de acción antimicrobiana.....	20
2.7.2.3. Limitaciones de actividad antimicrobiana en asociación con $\text{Ca}(\text{OH})_2$...	21
2.7.2.4 Limitaciones de citocompatibilidad en asociación con $\text{Ca}(\text{OH})_2$	21

2.8. ASOCIACIÓN DE N-ACETILCISTEÍNA CON HIDRÓXIDO DE CALCIO COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO.....	22
2.8.1. N-acetilcisteína	22
2.8.1.1. Características antioxidantes.....	22
2.8.1.2. Actividad antimicrobiana.....	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
IV. JUSTIFICACIÓN.....	26
V. HIPÓTESIS	27
5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	27
5.2. HIPÓTESIS NULA (H0)	27
5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)	27
VI. OBJETIVOS.....	28
6.1. OBJETIVO GENERAL	28
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
VII. VARIABLES.....	29
7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES.....	29
7.2. VARIABLES DEPENDIENTES	29
7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES.....	29
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
8.1. TIPO DE ESTUDIO.....	30
8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO	30
8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL	31
8.4. METODOLOGÍA	32

8.4.1. Preparación de las muestras	32
8.4.1.1. Conformación de los OD	32
8.4.1.2. Preparación de las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína y tratamiento de los OD.....	34
8.4.2. Obtención de muestras de lixiviados de los Sistemas de estudio en condiciones fisiológicas simuladas	38
8.4.3. Incubación celular en presencia de las muestras de lixiviados.....	40
8.4.4. Evaluación de la citocompatibilidad a través de ensayos ELISA	43
8.4.5. Evaluación de la morfología celular por microscopia óptica	46
8.4.6. Evaluación de pH de las mezclas/medicamentos de estudio	46
8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
IX. RESULTADOS.....	49
9.1. EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR POR MICROSCOPIA ÓPTICA A 24 Y 48 h.....	49
9.2. EVALUACIÓN DE CITOCOMPATIBILIDAD POR ENSAYOS ELISA A 24 Y 48 h.	52
9.3. EVALUACIÓN DE pH DE LAS MEZCLAS/MEDICAMENTOS DE ESTUDIO	54
X. DISCUSIÓN	56
XI. CONCLUSIONES.....	59
10.1. EVALUACIÓN DE CITOCOMPATIBILIDAD POR ENSAYOS ELISA	59
10.1. EVALUACIÓN DE pH	60
XII. RECOMENDACIONES	61
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Campo de la Endodoncia: la pulpa necrótica.	4
Figura 2. Biopelículas bacterianas en el conducto radicular.	7
Figura 3. Llenado del conducto radicular con $\text{Ca}(\text{OH})_2$	17
Figura 4. Radiografías iniciales de los OD.	32
Figura 5. Estandarización de la longitud de los OD.	33
Figura 6. Conformación de los OD.	34
Figura 7. Preparación y colocación de las mezclas hidróxido del calcio:N-acetilcisteína como medicación intraconducto a los OD.	35
Figura 8. Sellado de la entrada del conducto radicular con resina gingival.	36
Figura 9. Esterilización de los OD en etanol al 70%.	37
Figura 10. Radiografías de OD con la medicación intraconducto.	37
Figura 11. OD sumergidos en medio de cultivo celular.	38
Figura 12. Producción de muestras de lixiviados en incubación dinámica controlada en un agitador de oscilación de vaivén a una oscilación de 70 rpm y 37 °C durante 96 h.	39
Figura 13. Tubos falcon con OD en el seno del medio de cultivo celular después de 94 h de incubación dinámica.	39
Figura 14. Trasvasado de muestras de lixiviados producidos de las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$:NAC.	40
Figura 15. Placa celular con células en pocillos (densidad de 15,000 células/pocillo).	41
Figura 16. Micrografías bajo microscopio óptico de la línea celular MDA-MB-231.	42
Figura 17. Depósito de muestras de lixiviados a pocillos de placas de cultivo con células.	42
Figura 18. Incubación celular en presencia de lixiviados a 24 y 48 h.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 19. Fijación celular con glutaraldehído al 11%.	44
Figura 20. Tinción de células con cristal violeta al 0.1%.	44
Figura 21. Disolución de cristal violeta adherido a células.	45
Figura 22. Lectura de la absorbancia de las muestras en lector de placas ELISA.....	46
Figura 23. Preparación de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC para evaluación de pH.	47
Figura 24. Medición de valores de pH de las mezclas/medicamentos de estudio.	48
Figura 25. Morfología celular a las 24 h de incubación.	50
Figura 26. Morfología celular a las 48 h de incubación.	51
Figura 27. Porcentaje de citocompatibilidad de mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína a las 24 y 48 h.	53
Figura 28. Valor de pH de las mezclas/medicamentos a distintos tiempos de incubación en agua destilada.	55

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Citocompatibilidad (%).....	45
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
μl	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza (por sus siglas en inglés)
Ca(OH)₂	Hidróxido de calcio
CHX	Clorhexidina
CMCP	Paramonoclorofenol alcanforado
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (por sus siglas en inglés)
EAS	Sustancia de agregación enterotóxica (por sus siglas en inglés)
ECM	Matriz extracelular (por sus siglas en inglés)
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EPS	Sustancia polimérica extracelulares hidratadas (por sus siglas en inglés)

LISTA DE ABREVIATURAS

et al. et alii (latín: y otros)

etc. Etcétera

g Gramos

GSH Glutación

h Horas

LPS Lipopolisacárido

mg Miligramos

min Minutos

ml Mililitros

mM Milimolar

mm Milímetros

NAC N-acetilcisteína

NaClO Hipoclorito de sodio

nm Nanómetros

LISTA DE ABREVIATURAS

OD	Órganos dentarios
pH	Potencial hidrogeno
Rv	Resolvinas
s	Segundos
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colonias

I. RESUMEN

Introducción: El éxito del tratamiento endodóntico de órganos dentarios (OD) con periodontitis apical depende de la eliminación de la infección intrarradicular. La preparación quimicomecánica del conducto radicular no es suficiente para eliminar esta infección porque muchos microorganismos están diseminados por todo el sistema del conducto radicular en forma de biofilm bacteriano. Por tanto, la medicación intraconducto está indicada como auxiliar a la reducción o eliminación de microorganismos presentes en el sistema del conducto radicular. Un medicamento ideal debe presentar características de actividad antimicrobiana y citocompatibilidad. El hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) ha sido considerado como el medicamento antimicrobiano más favorable, sin embargo, su actividad antibacteriana se ve limitada contra varios microorganismos que poseen alta capacidad de formar biofilm, cuya matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) actúa como barrera biológica contra el medicamento. En este estudio se propone a la N-acetilcisteína (NAC) como un fármaco de asociación con Ca(OH)_2 , debido a su principal mecanismo de acción que consiste en reducir la producción de polisacáridos extracelulares, alterando así el biofilm bacteriano, sumando que al ser un potente antioxidante la NAC participa en procesos celulares importantes, incluida la protección de las células contra compuestos tóxicos, daño oxidativo e inflamación, además de promover la proliferación celular. **Objetivo:** Evaluar los porcentajes de citocompatibilidad de mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína (Ca(OH)_2 :NAC) empleadas como medicación intraconducto por ensayos in vitro a 24 y 48 h. **Métodos:** 18 OD extraídos fueron tratados con mezclas de Ca(OH)_2 :NAC en proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3 (n=3) como medicación intraconducto. Se obtuvieron muestras de lixiviados a partir de la incubación de los OD tratados con las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC en condiciones fisiológicas simuladas. Se evaluó la citocompatibilidad de los lixiviados obtenidos de cada una de las muestras a las 24 y 48 h a través de ensayos de microscopia óptica (morfología celular) y mediante ensayos ELISA (porcentaje de citocompatibilidad). Los valores de pH de las diferentes muestras de estudio fueron evaluados tras su inmersión en agua destilada durante 30 min, 1 h, 24 h, 7 días y 14 días

a temperatura ambiente empleando tiras medidoras de pH. **Resultados:** Con respecto a la morfología de las células expuestas a los lixiviados de las mezclas de estudio se confirma que no existió alteración celular a las 24 y 48 h al ser comparadas con las células libres de lixiviados. Los resultados por ensayos ELISA exhibieron un porcentaje de citocompatibilidad de las mezclas de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$ de entre 78% y 130% en todos los casos de estudio a las 24 y 48 h de incubación, con diferencia estadísticamente significativa entre la mezcla de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$ en proporción 1:0.3 y la mezcla de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$ en proporción 1:1 y Control NAC respectivamente ($p < 0.05$). Por último, el carácter alcalino de las mezclas de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$ (pH entre 12 y 13), se mantuvo con el tiempo. **Conclusiones:** La morfología de las células expuestas a los lixiviados de las mezclas $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$ confirmaron que no existió alteración celular en comparación a las células libres de lixiviados a las 24 y 48 h, exhibiendo una alta citocompatibilidad, la cual fue confirmada por ensayos ELISA demostrando las mezclas de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$ en todas sus proporciones de estudio demostraron ser altamente citocompatibles con porcentajes de entre 78% y 130% a las 24 y 48 h. Finalmente el carácter alcalino (pH 12-13).de las mezclas de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$, se mantuvo constante con el tiempo

II. INTRODUCCIÓN

2.1. ENDODONCIA

La endodoncia es la disciplina de la odontología que se ocupa de la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental y del tejido perirradicular. El estudio y aplicación práctica de la endodoncia comprenden los siguientes aspectos: etiología, diagnóstico, profilaxis, tratamiento de la patología y lesiones traumáticas de la pulpa dental, así como el tratamiento de las alteraciones patológicas perirradiculares secundarias a la patología pulpar (1). Constituyendo la parte medular de la endodoncia, el tratamiento de conductos permite eliminar las bacterias del conducto radicular infectado (2), con la finalidad de optimizar la desinfección del sistema de conductos radicular así como de prevenir la reinfección y que la pieza dentaria natural pueda mantenerse a largo plazo en boca sin causar enfermedades inflamatorias o efectos adversos para la salud sistémica (3). En 1958, Ingle señala que el éxito en el tratamiento de conductos está en el cumplimiento de la llamada “Tríada Endodóntica”, compuesta por tres principios básicos: asepsia, preparación biomecánica y sellado apical (4).

2.2. DESINFECCIÓN DEL CONDUCTO RADICULAR (ASEPSIA)

En endodoncia la periodontitis apical se describe como una enfermedad inflamatoria de etiología infecciosa localizada en el sistema del conducto radicular y se explica como el resultado de los efectos patogénicos de los microorganismos que colonizan dicho sistema, la infección endodóntica se desarrolla en los conductos radiculares en ausencia de las defensas del huésped, como consecuencia de la necrosis de la pulpa (como una secuela de la caries, un traumatismo, una afección periodontal o procedimientos quirúrgicos iatrogénicos etc.) (5,6). Se ha detectado la presencia de hongos y más recientemente arqueas y virus en las infecciones endodónticas, pero las bacterias constituyen los principales microorganismos implicados en la patogenia de la periodontitis apical. Las bacterias que colonizan el sistema de conductos radicular entran en contacto con los tejidos perirradiculares a través de los forámenes apicales o laterales,

II. INTRODUCCIÓN

después se produce el encuentro entre las bacterias y defensas del huésped y comienzan las reacciones inflamatorias en los tejidos perirradiculares, que dan paso al desarrollo de la periodontitis apical (Figura 1). El tratamiento exitoso de la periodontitis apical se basa en un control efectivo de la infección (6).

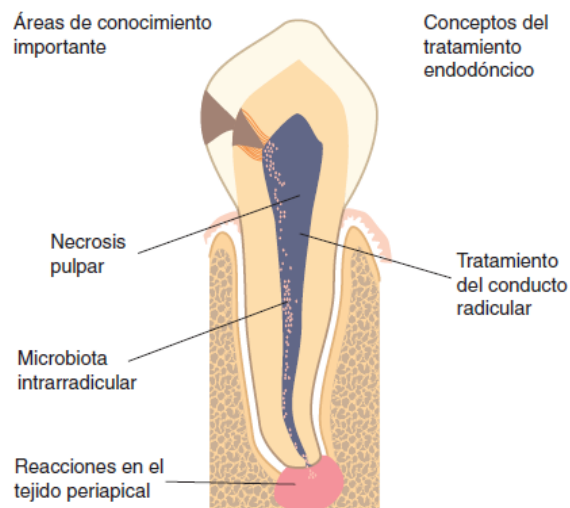


Figura 1. Campo de la Endodoncia: la pulpa necrótica.

En la figura 1 se observa la presencia de microbiota en el sistema de conductos radicular en un órgano dentario con necrosis pulpar, los cuales generan reacciones en el tejido periapical (2).

La asepsia se define como la ausencia de infección y la prevención del contacto con microorganismos (7). La asepsia en el tratamiento de conductos se basa en la preparación quimicomecánica (instrumentación e irrigación del sistema de conductos) y es parte imprescindible del tratamiento de conductos por que elimina del sistema de conductos el tejido necrótico, los microorganismos y sus productos. La curación de la periodontitis apical es ciertamente más predecible cuando la carga de microorganismos se erradica o al menos se reduce sustancialmente a niveles que son compatibles con la reparación del tejido perirradicular (8).

Dado que los microorganismos desempeñan un papel primordial en la patogénesis de la periodontitis apical es preciso manejar los fundamentos de la microbiología endodóntica para entender el papel que desempeñan en esta afección (9).

En la literatura las infecciones endodónticas se pueden clasificar o dividir según su localización anatómica así como el momento en que los microorganismos entran en el sistema del conducto radicular (6).

2.3. TIPOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS

2.3.1. Infección extrarradicular

Se caracteriza por la invasión microbiana de los tejidos perirradiculares inflamados y es una secuela de la infección intrarradicular, y pueden ser dependientes o independientes de la infección intrarradicular (6).

2.3.2. Infección intrarradicular

Se debe a microorganismos que colonizan el sistema del conducto radicular, y se puede subdividir en tres categorías (infección primaria, infección secundaria e infección persistente) donde implica el momento en donde los microorganismos entran en el sistema del conducto radicular (6).

2.3.2.1. Infección Primaria

Causada por microorganismos que invaden y colonizan el tejido necrótico de la pulpa en un primer momento también conocida como infección inicial o virgen. Los procesos patológicos de la pulpa dental son causados generalmente por caries, procedimientos restauradores o traumatismos los cuales comienzan con un proceso inflamatorio, y terminan con la necrosis pulpar (6,10).

2.3.2.2. Infección Secundaria

Causada por microorganismos que no están presentes en la infección primaria pero que son introducidas en el conducto radicular en algún momento después de la intervención

profesional (es decir, es secundaria a la intervención) (6). Esto generalmente ocurre debido a la introducción de microorganismos en el sistema de conducto radicular durante el tratamiento endodóntico, especialmente en los casos en que el diente se deja abierto por una alguna indicación clínica, por filtraciones de pastas temporales durante los períodos de intercitas, filtraciones coronales por restauración permanente defectuosa, etc. (11).

2.3.2.3. *Infección persistente*

Causada por los microorganismos que fueron componentes de la infección primaria y secundaria y que resistieron de alguna forma de los procedimientos antimicrobianos que tienen lugar dentro del conducto y que pudieron persistir en periodos de privación de nutrientes en los conductos tratados, en otras palabras, los conductos radiculares tratados sin éxito pueden presentar una inflamación e infección persistente (6,12).

Durante la preparación quimicomecánica del conducto radicular se puede reducir la infección endodóntica, sin embargo, pueden dejarse áreas donde no es posible acceder con instrumentos y soluciones desinfectantes ya que numerosos estudios han resaltado que las bacterias no solo se adhieren a las paredes de los conductos radiculares, sino que también existen en aletas, ramificaciones, conductos laterales y túbulos dentinarios, provocando que algunos microorganismos puedan sobrevivir dentro de la anatomía compleja del sistema radicular después del tratamiento de conductos (3,13).

Las bacterias en el conducto radicular pueden aislarse como células planctónicas, suspendidas en la fase líquida del conducto radicular y en forma de agregados o congregaciones adheridas a las paredes del conducto radicular, dando lugar a varias capas de biopelículas. Las biopelículas son un modelo de crecimiento bacteriano donde las células sésiles interactúan para formar comunidades dinámicas de una o varias especies que se acumulan en las interfaces (sólido-líquido o sólido-aire) unidas a un sustrato sólido y ubicadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares hidratadas (EPS, por sus siglas en inglés) (11) (Figura 2). Para sobrevivir en un conducto obturado, los microorganismos deben soportar las medidas de desinfección (preparación

quimicomecánica y medicaciones intraconducto) y deben adaptarse a un entorno con poca disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, solo las pocas especies que tienen estas habilidades pueden estar involucradas en el fracaso del tratamiento endodóntico (14).

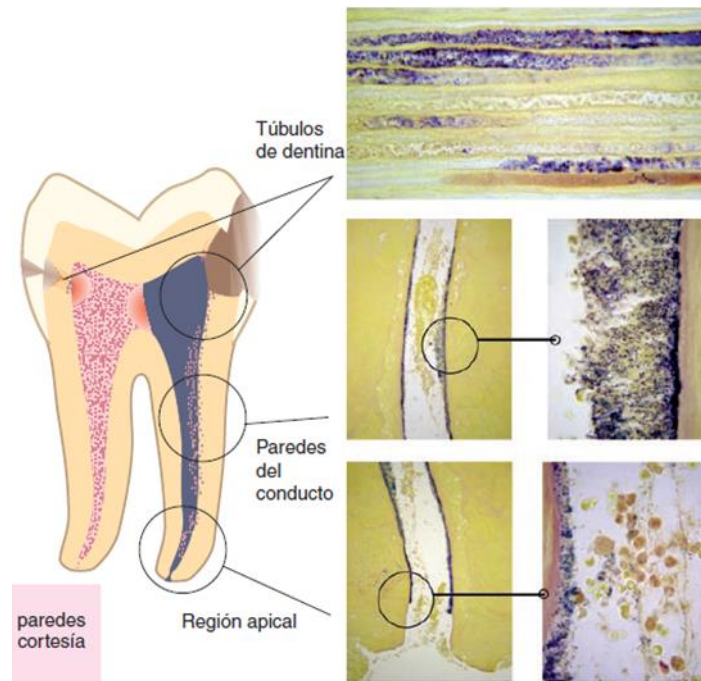


Figura 2. Biopelículas bacterianas en el conducto radicular.

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

2.4. DIVERSIDAD BACTERIANA DE INFECCIONES PERSISTENTES

La microbiota en conductos aparentemente bien tratados albergan entre 1 y 5 especies, pero el número de especies cuando el tratamiento de conductos es inadecuado o fallido puede ascender hasta 10 o 30, llegando a un número de células bacterianas de entre 10^3 a 10^7 por conducto (6). En varios estudios de cultivos y biología molecular se han identificado en estos casos bacterias anaerobios facultativos y obligadas siendo los más comunes *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) *Campylobacter rectus* (*C. rectus*) , especies de *Prevotella* o bacterias gram positivas como *Streptococcus mitis* (*S. mitis*),

Streptococcus gordonii (*S. gordonii*), *Streptococcus anginosus* (*S. anginosus*), *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) y *Streptococcus oralis* (*S. oralis*), especies de *Actinomyces* como *Actinomyces israelii* (*A. israelii*) y *Actinomyces odontolyticus* (*A. odontolyticus*) especies de *Propionibacterium* predominando *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) y *Propionibacterium propionicum* (*P. propionicum*), especies de *Lactobacillus* presentándose con mayor frecuencia *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) y *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) y por ultimo especies de *Enterococcus* siendo el de mayor interés *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (11,15).

2.4.1. *Enterococcus faecalis*

2.4.1.1. Prevalencia en infecciones endodónticas persistentes

De todos los casos que informan inflamación e infección después de la terapia endodóntica, se ha observado que *E. faecalis* es el microorganismo más comúnmente encontrado, siendo uno de los principales causantes del fracaso del tratamiento endodóntico ya que puede sobrevivir dentro del conducto radicular como un solo organismo o como un componente principal de la microflora desempeñando un papel importante en la etiología de las lesiones perirradiculares persistentes que a su vez representa una estadística que varía de 24 a 77% en dientes con tratamiento endodóntico fallido (16).

2.4.1.2. Patogenicidad

E. faecalis no es un comensal de la cavidad oral, si no un patógeno oportunista y solo se encuentra ocasionalmente; de hecho, está notoriamente presente en el tracto gastrointestinal, colonizando nichos de la mucosa oral solo por cortos períodos en los que es posible encontrarlo. Se puede establecer que la forma principal de penetración de *E. faecalis* en los conductos radiculares es después de la ingesta de alimentos contaminados y después del tratamiento endodóntico por infiltración de la restauración coronal después del tratamiento endodóntico (15).

2.4.1.3. Morfología y características

Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos con forma ovoide que pueden presentarse individualmente, en pares o como cadenas cortas y tienen un diámetro de 0.5 a 1 micrómetro. Son anaerobios facultativos, que poseen la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno (17). Las especies de *Enterococcus* viven en grandes cantidades (10⁵-10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces) en la luz intestinal humana y, en la mayoría de los casos, no causan daño a sus huéspedes (18). Catabolizan una variedad de fuentes de energía que incluyen carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina y muchos cetoácidos (17), y sobreviven en ambientes muy hostiles que incluyen pH alcalino extremo (9.6) y altas concentraciones de sal, resisten sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol y desecación, pueden crecer en el rango de 10 a 45 °C y sobrevivir a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos (16).

2.4.1.4. Factores de virulencia

Los factores de virulencia más importantes son la sustancia de agregación enterocócica (EAS, por sus siglas en inglés), las adhesinas de superficie bacteriana, las feromonas sexuales, el ácido lipoteicoico, la producción de superóxido extracelular, citolisina, hemolisina y la liberación de dos enzimas líticas importantes: gelatinasa y hialuronidasa (19). Se ha reportado que se adhiere a las células huésped y expresa proteínas que le permiten competir con otras células bacterianas y altera las respuestas del huésped así como el medio ambiente (17). Además de *E. faecalis* puede establecer una infección extra radicular secretando endotoxinas directamente o mediante la inducción de inflamación indirectamente (19). Estos factores de virulencia pueden o no contribuir a las características innatas de *E. faecalis* para causar la enfermedad, debido a que *E. faecalis* depende menos de los factores de virulencia y más de su capacidad para sobrevivir y persistir como un patógeno en los conductos radiculares de los dientes (16), además de que es lo suficientemente pequeño como para invadir y vivir dentro de los túbulos dentinarios y soportar períodos prolongados de inanición hasta que esté disponible un suministro nutricional adecuado (20).

II. INTRODUCCIÓN

Los *Enterococos* en las biopelículas son más resistentes a los antibióticos que los *Enterococos* en crecimiento planctónico, por lo que el impacto potencial de la formación de biopelículas podría ser significativo (21), entre los diferentes aislamientos bacterianos clínicos recuperados de infecciones endodónticas, *E. faecalis* 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). Las propiedades fisicoquímicas de las biopelículas de *E. faecalis* se modifican de acuerdo con las condiciones ambientales y de nutrientes predominantes, en un entorno rico en nutrientes *E. faecalis* produce estructuras típicas de biopelículas con agregados superficiales característicos de células bacterianas y canales de agua. El desarrollo de la biopelícula de *E. faecalis* en la dentina del conducto radicular implica tres etapas de la siguiente manera (22,23):

Etapas 1: Las microcolonias se forman a medida que las células de *E. faecalis* se adhieren a la superficie de la dentina del conducto radicular (24).

Etapas 2: La disolución mediada por bacterias de la fracción mineral del sustrato de dentina conduce a un aumento localizado en los iones de calcio y fosfato, causando la mineralización (o calcificación) de la biopelícula de *E. faecalis* (24).

Etapas 3: Debido a esta interacción de las bacterias y sus productos metabólicos en la dentina, la biopelícula de *E. faecalis* se mineraliza (24).

En conclusión, la desinfección es un aspecto clave en la preparación de los conductos radiculares antes de la obturación, y la irrigación como la medicación intraconducto son los medios químicos del desbridamiento para la eliminación de las bacterias y los desechos necróticos del conducto, por ello que se ha recomendado el uso de la medicación intraconducto entre citas para eliminar las bacterias que no fueron eliminadas durante la preparación quimicomecánica en la terapia endodóntica, con el fin de complementar la desinfección del sistema de conductos de una manera más efectiva y mejorar el resultado exitoso de la terapia endodóntica (13).

2.5. MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

Según Kawashima *et al.*, el medicamento intraconducto se define como la colocación temporal de medicamentos con buena biocompatibilidad en los conductos radiculares con el objetivo de inhibir la proliferación bacteriana y posiblemente incluso mejorar la supresión bacteriana de bacterias sobrevivientes (25). La medicación intraconducto generalmente se recomienda cuando el tratamiento no puede completarse en una cita; ya que existen posibilidades de que las bacterias intrarradiculares sobrevivientes a menudo proliferen entre las citas, (26,27). La cuestión del papel de la medicación intraconducto se vuelve más relevante en el tratamiento de casos con necrosis pulpar y periodontitis apical (25).

Hay evidencia abrumadora en la literatura de que la mayoría de los conductos radiculares contienen microorganismos viables incluso después de la finalización de la preparación quimicomecánica, sin embargo mediante el uso de medicación intraconducto, es posible que se logre una instrumentación más completa debido al mayor tiempo total utilizado para el tratamiento (25), Vera *et al.*, indican que esta estrategia es realmente efectiva para reducir la carga biológica bacteriana en todo el sistema de conductos ya que se necesita tiempo para que los procedimientos terapéuticos antibacterianos de la medicación intraconducto afecten a las bacterias ubicadas en las complejidades anatómicas y luego maximicen la reducción bacteriana a niveles que no se pueden lograr en una cita, además de los efectos del medicamento intraconducto la reinstrumentación con el último instrumento apical y una irrigación final con hipoclorito de sodio (NaOCl) o clorhexidina (CHX) en la segunda visita podría contribuir a una mejor desinfección de los conductos principales (28).

2.5.1. Propiedades de un medicamento intraconducto ideal

Un medicamento intraconducto ideal debe tener amplias propiedades antimicrobianas, alta compatibilidad con el tejido periapical e inducir la reparación del tejido duro, reducir la inflamación, permanecer estable en solución, tener un efecto antimicrobiano prolongado, ser activo en presencia de sangre, suero y derivados proteicos de tejidos,

tener baja tensión superficial, no manchar la estructura dental y no inducir una respuesta inmune mediada por células (25,29).

2.5.1.1. Citocompatibilidad de un medicamento intraconducto

La naturaleza química de los medicamentos empleados para la desinfección del conducto radicular es variada; provienen de diferentes grupos, sustancias químicas o combinaciones de reactivos o fármacos, por lo tanto, se espera que la medicación intraconducto antibacteriana sea eficaz durante todo su período de aplicación sin causar daño a los tejidos circundantes (30), ya que estos medicamentos pueden entrar en contacto con los tejidos periapicales, ya sea por extrusión desde el ápice o por lixiviación. Es entonces que no deberían ser tóxicos e inducir una curación ósea (31).

La citotoxicidad se define como la capacidad de un material para afectar la viabilidad celular y puede medirse en varios puntos finales fisiológicos tales como reducción en el crecimiento y proliferación celular, necrosis, apoptosis o combinaciones de estos aspectos. La citocompatibilidad se define como cualquier material o sustancia que no produce reacciones perjudiciales en uno o varios tipos celulares cuando interacciona con ellos. La evaluación de la actividad citotóxica de los medicamentos intraconductos es de gran importancia ya que afecta el comportamiento biológico y fisiológico de estas células. (32).

2.5.2. Indicaciones de una medicación intraconducto

En los conductos radiculares infectados, se ha recomendado la medicación intracanal por las razones de (29):

- i. Eliminar cualquier bacteria restante después de la instrumentación del conducto.
- ii. Reducir la inflamación de los tejidos perirradiculares.
- iii. Hacer que el contenido del conducto sea inerte y neutralizar el debris.
- iv. Actuar como barrera contra filtraciones de la restauración temporal.
- v. Ayudar a secar conductos con persistencia de humedad (exudado, sangrado).

Los medicamentos intraconducto tienden a ser efectivos contra microorganismos que pueden haber resistido la preparación del conducto radicular. Además, controlan la exudación persistente y la acción destructiva de los osteoclastos, el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se ha utilizado ampliamente en endodoncia como medicamento intraconducto y se conoce como el estándar de oro para la medicación intraconducto ya que posee muchas de las propiedades de un apósito ideal (33,34).

2.6. HIDRÓXIDO DE CALCIO

Desde que Hermann introdujo al hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) a la odontología en 1920 en Alemania como agente de recubrimiento pulpar (35), se ha utilizado ampliamente en endodoncia para varios procedimientos, como recubrimiento directo e indirecto, apicogénesis, apicoformación, tratamiento de resorción de raíz y perforaciones iatrogénicas además el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se considera la primera opción de la medicación intraconducto entre citas debido a que genera pocas reacciones adversas, su importante actividad biológica y antimicrobiana, su capacidad para disolver tejido orgánico e inactivar la endotoxina bacteriana (36,37). La inactivación o neutralización de las endotoxinas bacterianas es un aspecto esencial en la selección de un agente antimicrobiano, se ha evidenciado que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hidroliza el compuesto lipídico del lipopolisacárido (LPS) bacteriano, lo que resulta en la liberación de ácidos grasos hidroxilados libres, este resultado sugiere que la degradación de LPS mediada por $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puede ser una razón importante de los efectos beneficiosos obtenidos con el uso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en endodoncia clínica (38).

2.6.1. Características químicas

El hidróxido de calcio es un polvo inoloro blanco con la fórmula $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y un peso molecular de 74.09, tiene baja solubilidad en agua (aproximadamente 1.2 g/l a 25 °C), que disminuye a medida que aumenta la temperatura; además libera iones de calcio (Ca^{2+}) e hidroxilo (OH^-) lentamente al entrar en contacto con una solución acuosa, la baja solubilidad es una buena característica clínica porque es necesario un largo período para que $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se vuelva soluble en fluidos tisulares cuando está en contacto directo con

tejidos vitales, cabe destacar que es insoluble en alcohol (36). El Ca(OH)_2 tiene un pH alto (12.5 - 12.8) y está químicamente clasificado como una base fuerte y los iones de hidroxilo son responsables de esta naturaleza altamente alcalina, la mayoría de los patógenos no pueden sobrevivir en el ambiente altamente alcalino proporcionado por Ca(OH)_2 (39). Dado que el pH del Ca(OH)_2 es de aproximadamente 12.5, las bacterias en el conducto radicular infectado se eliminan cuando están en contacto directo con esta sustancia (33).

2.6.2. Mecanismos de actividad antimicrobiana del Ca(OH)_2

La mayoría de los patógenos endodónticos no sobreviven en el ambiente altamente alcalino del Ca(OH)_2 , como lo demostraron Bystrom *et al.* mediante la eliminación de varias especies bacterianas que se encuentran comúnmente en los conductos radiculares infectados después de un corto período de contacto directo con el material (40). Esto se debe a que los iones hidroxilo son radicales libres altamente oxidantes que muestran una reactividad extrema con varias biomoléculas, los efectos letales de los iones hidroxilo en las células bacterianas se deben probablemente a los siguientes mecanismos (36):

2.6.2.1. Daño a la membrana citoplasmática bacteriana

La membrana citoplasmática bacteriana posee funciones importantes para la supervivencia de la célula, como la permeabilidad selectiva y el transporte de solutos, transporte de electrones y fosforilación oxidativa en especies aeróbicas así como excreción de exoenzimas hidrolíticas, los iones hidroxilo del 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. Por lo tanto, los peróxidos en sí actúan como radicales libres, iniciando una reacción en cadena autocatalítica y provocando una mayor pérdida de ácidos grasos insaturados y un daño extenso de la membrana (41).

2.6.2.2. *Desnaturalización de proteínas*

El metabolismo celular depende en gran medida de las actividades enzimáticas, las enzimas tienen una actividad y estabilidad óptimas en un rango estrecho de pH, la alcalinización proporcionada por el 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 (41).

2.6.2.3. *Daño al ADN*

Los iones hidroxilo reaccionan con el ADN bacteriano e inducen la división de las cadenas donde existe pérdida de los genes, en consecuencia, se inhibe la replicación del ADN y se altera la actividad celular. Los radicales libres también pueden inducir mutaciones del ADN que pueden ser letales (41).

La evidencia científica sugiere que pueden ocurrir los tres mecanismos (daño a la membrana citoplasmática, desnaturalización de proteínas y daño al ADN) por lo tanto, es difícil establecer, en un sentido cronológico, cuál es el principal mecanismo involucrado en la muerte de las células bacterianas después de la exposición a una base fuerte (36).

2.6.3. Preparación de pasta de hidróxido de calcio como medicación intraconducto

Cuando el polvo de Ca(OH)_2 se mezcla con un vehículo adecuado se forma una pasta, en general, se utilizan tres tipos de vehículos para preparar pasta de Ca(OH)_2 : acuoso, viscoso y aceitoso (42), en el primer grupo está representado por sustancias solubles en agua que incluyen agua, solución salina, anestésicos dentales con o sin vasoconstrictor, agua destilada y solución de Ringer (36), estos vehículos acuosos promueve el alto grado de solubilidad cuando la pasta permanece en contacto directo con tejidos y fluidos

tisulares, provocando que sea rápidamente solubilizada y reabsorbida por macrófagos. Algunos vehículos viscosos también son sustancias solubles en agua sin embargo liberan iones de Ca^{2+} y OH^- más lentamente por períodos prolongados, promueven la baja solubilidad de la pasta en comparación con los vehículos acuosos, probablemente debido a sus altos pesos moleculares, algunos ejemplos de vehículos viscosos son la glicerina, el polietilenglicol y el propilenglicol. Los vehículos aceitosos son sustancias no solubles en agua que promueven la menor solubilidad y difusión de la pasta dentro de los tejidos, algunos ejemplos de estos vehículos son aceite de oliva, aceite de silicona, alcanfor, entre otros (42).

En un estudio *in vitro*, Estrela *et al.* mostraron que el tipo de vehículo tiene una relación directa con la concentración y la velocidad de liberación iónica, así como con la acción antibacteriana cuando la pasta se transporta a un área contaminada (43), químicamente, los vehículos acuosos inducen una mayor velocidad de disociación iónica que los vehículos viscosos y aceitosos por lo tanto, los vehículos con características hidrosolubles tienen ventajas sobre los vehículos no hidrosolubles (44).

Para poder crear la consistencia de pasta deseada el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se debe mezclar con el vehículo acuoso o hidrosoluble hasta formar una pasta espesa que contenga la mayor cantidad posible de partículas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, la pasta se aplica mejor con un léntulo espiral. Para conseguir la máxima efectividad, es importante que el conducto radicular se llene de forma homogénea hasta la longitud de trabajo en el conducto radicular al momento de colocarse como medicación intraconducto (Figura 3) (6); todavía se desconoce el período necesario para que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ desinfeste de manera óptima el sistema de conducto radicular y los estudios clínicos que utilizan los procedimientos de muestreo del conducto radicular han revelado resultados contradictorios. Bystrom *et al.* demostraron que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ eliminaba eficazmente todos los microorganismos cuando se mantenía el medicamento durante 4 semanas (40).

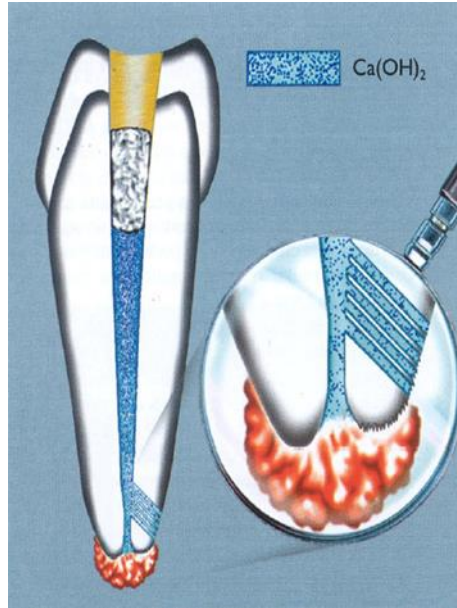


Figura 3. Llenado del conducto radicular con Ca(OH)_2 .

En la figura 3 se muestra la difusión del Ca(OH)_2 hacia los túbulos dentinarios en el conducto radicular (45).

Reit y Dahlen encontraron que la infección persistía en el 26% de los conductos después de 2 semanas de medicación con Ca(OH)_2 . Sjogren *et al.* informaron que la medicación intraconducto con Ca(OH)_2 durante 1 semana eliminó efectivamente las bacterias en el conducto radicular en el 100% de los casos. Barbosa *et al.* reportaron que el 26.7% de los casos tratados con Ca(OH)_2 durante 1 semana dieron cultivo positivo. Ørstavik *et al.* (1991) observaron la persistencia de bacterias en el 34.8% de los conductos radiculares después de 1 semana de medicación intraconducto. La variación en los resultados presentados puede tener orígenes metodológicos, así como deberse a los pequeños tamaños de muestra utilizados en este tipo de estudios (36,41).

2.6.4. Limitaciones del hidróxido de calcio como medicación intraconducto

El uso, la manipulación y la colocación de Ca(OH)_2 es un reto para el profesional medio, además la eliminación de Ca(OH)_2 suele ser incompleta, en donde el Ca(OH)_2 residual puede acortar el tiempo de fraguado de selladores endodónticos de óxido de zinc y

eugenol (6). Estudios *in vitro* han demostrado que la dentina puede inactivar la actividad antibacteriana del $\text{Ca}(\text{OH})_2$, otra limitante que presenta el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ son su baja solubilidad y baja difusión, lo que puede dificultar alcanzar un aumento rápido y significativo del pH para eliminar las bacterias presentes en biopelículas, túbulos dentinarios y restos de tejido; además no es totalmente eficaz frente a varios patógenos endodónticos como el *E. faecalis* que presenta resistencia al $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (46), debido a su alta tolerancia a la alcalinidad que podría estar influenciada por efectos de taponamiento de la dentina, de modo que no se puede lograr un aumento de pH dentro de los túbulos dentinarios, donde comúnmente se aloja este patógeno debido a su capacidad para formar biopelículas en conductos tratados sin el apoyo sinérgico de otras bacterias, sumándole la operación de una bomba de protones que acidifica el citoplasma bacteriano e impide la inhibición enzimática del microorganismo (47,48). Aunque se ha informado que *E. faecalis* soporta el alto pH del $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se sabe relativamente poco sobre los mecanismos de supervivencia que le permiten tolerar la exposición al $\text{Ca}(\text{OH})_2$. En general, cuando las bacterias enfrentan un desafío adverso o potencialmente letal, se genera una respuesta de estrés que les permite soportar la amenaza, sobrevivir y recuperarse esta respuesta adaptativa puede contribuir a la patogénesis. Se ha demostrado que *E. faecalis* sintetiza una variedad de proteínas de estrés cuando se expone a condiciones ambientales adversas (49).

En un intento por eludir estas limitaciones antimicrobianas del $\text{Ca}(\text{OH})_2$, actualmente se han propuesto su combinación con otras sustancias antibacterianas como medicación intraconducto, como el paramonoclorofenol alcanforado (CMCP) y CHX entre otros y así mejorar las propiedades fisicoquímicas y su acción antibacteriana (50).

2.7. ASOCIACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS CON HIDRÓXIDO DE CALCIO

2.7.1. Paramonoclorofenol alcanforado

2.7.1.1. Características

El fenol o ácido carbólico es uno de los fármacos antimicrobianos más antiguos entre los usados en medicina (6). El monoclórofenol es un derivado del fenotipo y más antiséptico que el fenol, tiene tres isómeros de los cuales el paraclorofenol es el más efectivo. El paraclorofenol es sólido a temperatura ambiente y se puede licuar en alcanfor, la adición de alcanfor provoca una liberación más lenta de paraclorofenol y proporciona una medicación menos cáustica, además, el alcanfor sirve como vehículo y diluyente. La Asociación Dental Estadounidense aceptó el uso de paraclorofenol y CMCP para el tratamiento de conductos radiculares e infecciones periapicales (51). Sin embargo, recientes estudios *in vitro* han demostrado que el fenol y sus derivados son muy tóxicos para las células del mamífero, y que su efectividad antimicrobiana no se relaciona de forma favorable con la toxicidad (6).

2.7.1.2. Limitaciones de citocompatibilidad en asociación con Ca(OH)_2

La asociación de Ca(OH)_2 con CMCP proporciona un espectro antibacteriano más amplio, sin embargo se ha estudiado que su uso en un conducto radicular podría causar daño periodontal, impidiendo el objetivo final de la terapia periodontal que es la reinserción y regeneración del aparato de fijación (52). En conclusión los fenoles son antisépticos ineficaces bajo condiciones clínicas (6).

2.7.2. Clorhexidina

La Clorhexidina (CHX) es de la familia antibacteriana de las polibiguanidas y se desarrolló hace más de 50 años, desde 1957, se ha utilizado como desinfectante general así como para el tratamiento de infecciones de piel, ojos y garganta en humanos y animales (6).

2.7.2.1. Características químicas

La molécula de CHX está compuesta por dos estructuras simétricas con 4 anillos de clorofenilo y 2 grupos biguanida unidos por un puente central de hexametileno. Es una molécula básica muy fuerte y estable como sal. El compuesto CHX más utilizado en formulaciones desinfectantes es el gluconato. El gluconato de clorhexidina es un líquido casi incoloro o amarillo pálido y muy soluble en agua. La actividad de la clorhexidina depende del pH del medio ambiente y el rango óptimo es de 5.5 a 7.0. La actividad se reduce en presencia de suero, sangre, pus y otras materias orgánicas, así como en jabones y otros compuestos aniónicos (53).

2.7.2.2. Mecanismo de acción antimicrobiana

La CHX se considera un fármaco eficaz en odontología ya que se ha utilizado ampliamente en periodoncia ya que tiene actividad antimicrobiana contra organismos Gram positivos y Gram negativos, el efecto antimicrobiano de la CHX es causado por la unión de la molécula catiónica a las paredes de las células bacterianas cargadas negativamente, alterando así el equilibrio osmótico de la célula dañando las capas externas de la pared y haciéndola permeable (54), según sus concentración, la CHX puede tener efectos bacteriostáticos y bactericidas. En concentraciones altas, la CXH actúa como detergente, al dañar la membrana celular, causa una precipitación del citoplasma, y, por tanto, tiene efecto bactericida. A concentraciones bajas subletales, la CHX es bacteriostática, causando el vertido de sustancias de peso molecular bajo (potasio y fosforo), sin dañar la célula de forma irreversible (55).

En los últimos años la CXH se ha utilizado en endodoncia, y su combinación con Ca(OH)_2 también se ha estudiado, con la idea de que sus propiedades antimicrobianas interaccionen sinérgicamente, potenciando su eficacia (6). Si embargo los resultados no son concluyentes, algunos estudios *in vitro* han descrito una mejor acción antibacteriana con los dos agentes combinados, mientras que otros mostraron resultados contradictorios (56).

2.7.2.3. Limitaciones de actividad antimicrobiana en asociación con Ca(OH)_2

Una combinación de CXH e Ca(OH)_2 no arroja resultados comparativamente buenos debido a una diferencia en el pH de la clorhexidina y el Ca(OH)_2 en donde la CXH no es estable a un pH de 12 cuando se combina con Ca(OH)_2 , además la unión de la molécula de clorhexidina a los iones de Ca(OH)_2 crea una inhibición de la liberación libre de la molécula de clorhexidina ya que esta última se precipita cuando se mezcla con el Ca(OH)_2 (57). Recientemente se ha reportado el hecho de que la CXH es inactivada por sales fisiológicas y tiene una capacidad limitada de penetrar las capas profundas de las biopelículas lo que limita su uso como medicamento intraconducto (58). En conjunto, parece que la utilidad de mezclar Ca(OH)_2 con CHX no está clara y sigue siendo controvertida ya que no siempre mejorara su eficacia antimicrobiana (6).

2.7.2.4 Limitaciones de citocompatibilidad en asociación con Ca(OH)_2

En un estudio en perros De Rossi *et al.* demostró que la adición de CHX al 1% a la pasta de Ca(OH)_2 empleada como medicación intraconducto retrasa la reparación periapical de las lesiones inducidas experimentalmente (59).

Además, algunos autores han reportado que la CHX presenta citotoxicidad para los tejidos periapicales. Fera *et al.* evaluaron el grado de inflamación al inyectar clorhexidina al 0.5% y al 1% en patas de ratones y observaron el comportamiento de los fibroblastos y encontraron que hubo inflamación en las dos concentraciones, y que esta dependía del grado de concentración de la CHX. Donde hubo menos concentración, se generó menos lesión (60). Da Silva *et al.* evaluaron la respuesta del tejido conectivo subcutáneo de ratones en pastas de Ca(OH)_2 asociadas con CHX al 2%, las cuales indujeron la formación de un infiltrado inflamatorio y abundante exudado, sugiriendo una agresión residual persistente del material (61)

Debido a que es deseable el uso de agentes antimicrobianos alternativos que actúen sobre las formas de bacterias planctónicas y en biopelículas, se propone la combinación del Ca(OH)_2 con N-acetilcisteína (NAC), que es un potente antioxidante que contiene un grupo tiol que le confiere propiedades antimicrobianas contra los fenotipos de

biopelículas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además, se ha reportado que la NAC puede erradicar las biopelículas de *E. faecalis* debido a que se trata de un agente mucolítico que actúa al reducir la producción de polisacárido extracelular y la adhesión de bacterias en las superficies lo que lo hace como ideal para poder asociarse al Ca(OH)_2 (62). Al ser un potente antioxidante la NAC participa en procesos celulares importantes, incluida la protección de las células contra compuestos tóxicos, daño oxidativo y radiación, lo que le confiere ser un medicamento ideal para poder asociarse al Ca(OH)_2 (63).

2.8. ASOCIACIÓN DE N-ACETILCISTEÍNA CON HIDRÓXIDO DE CALCIO COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

2.8.1. N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC) es el derivado de N-acetilo del aminoácido natural L-cisteína y desde la década de 1960 se ha recetado ampliamente como un agente mucolítico (64), y su uso se ha mantenido en la práctica clínica ya que posee efectos terapéuticos sobre una amplia gama de trastornos los cuales incluyen fibrosis quística, intoxicación por paracetamol, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, toxicidad por metales pesados y trastornos psiquiátricos / neurológicos (65). Debido a su perfil de seguridad, la NAC se utiliza ampliamente por vía inhalatoria, oral e intravenosa, y en ensayos con NAC como tratamiento adyuvante para erradicar las biopelículas maduras preformadas e inhibir la producción de nuevas biopelículas (66).

2.8.1.1. Características antioxidantes

Al ser un derivado N-acetilo del aminoácido L-cisteína, NAC es un profármaco de cisteína y un precursor del glutatión (GSH) de los aminoácidos de tres componentes del GSH (es decir, 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 (67). Se ha reportado que la suplementación con NAC aumenta los niveles de glutatión, el principal antioxidante del cuerpo. El glutatión es de vital importancia para desintoxicar

una variedad de sustancias tóxicas, 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 (68). 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 (67). Aunque NAC no es un antibiótico, posee propiedades antimicrobianas que descomponen las biopelículas bacterianas de patógenos de importancia médica, en particular, la acción mucolítica se debe a la capacidad de la NAC (tiol) para romper los puentes disulfuro en las glicoproteínas de alto peso molecular del moco, lo que produce una viscosidad reducida. Estas características hacen que la NAC sea un candidato potencial para el manejo de enfermedades bucodentales (66).

2.8.1.2. Actividad antimicrobiana

Se ha propuesto el uso de NAC como un enfoque antibacteriano alternativo para controlar el crecimiento de biopelículas bacterianas en enfermedades humanas. De hecho, varios estudios *in vitro* informaron que NAC disminuye la formación de biopelículas por una variedad de bacterias (66). Las EPS 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 así las biopelículas maduras y reduciendo la adhesión de bacterias a las superficies. 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*) (58). Recientemente, se demostró que NAC inhibe el crecimiento de *E. faecalis* y erradica las biopelículas que lo componen (69).

II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen muchas alternativas de medicamentos para asociarse al Ca(OH)_2 y utilizarse como medicación intraconducto sin embargo es primordial tener información sobre su impacto en la salud humana es por eso que en el presente proyecto se evaluara la citocompatibilidad de la nueva asociación de NAC con Ca(OH)_2 para tener conocimiento sobre el potencial efecto citotóxico.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque el Ca(OH)_2 es el fármaco más empleado como medicación intraconducto, su actividad antibacteriana se ve limitada contra varios patógenos endodónticos que poseen alta capacidad de formar biofilm, cuya matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) actúa como barrera biológica contra el fármaco. Debido a lo anterior han surgido diferentes fármacos para la asociación Ca(OH)_2 , sin embargo, estos han dado resultados citotóxicos o con un potencial de actividad antimicrobiana irrelevantes. Es por eso por lo que surge la necesidad de utilizar conjuntamente un segundo medicamento que inhiba la producción de ECM, para que de esta forma se garantice la actividad antibacteriana del Ca(OH)_2 y que al mismo tiempo sea citocompatible.

IV. JUSTIFICACIÓN

Es bien sabido que la ECM del biofilm bacteriano inhibe la actividad antibacteriana del Ca(OH)_2 en el sistema de conductos radicular. Por tanto, surge la necesidad de explorar alternativas de tratamiento que garanticen la actividad antibacteriana del Ca(OH)_2 como medicación intraconducto, al mismo tiempo de inhibir la producción de ECM bacteriana y que no genere citotoxicidad. El enfoque propuesto en este proyecto es la utilización en conjunto del Ca(OH)_2 con un agente mucolítico: la N-acetilcisteína, como medicación intraconducto, evaluando el porcentaje de citocompatibilidad de las muestras 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 una viabilidad celular del al menos del 70%.

5.2. HIPÓTESIS NULA (H0)

Las células en cultivo en presencia y ausencia de lixiviados de las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3 desplegarán porcentajes de citocompatibilidad iguales e invariantes con el tiempo, con un nivel de confianza del 95%.

5.3. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)

Las células en cultivo en presencia de lixiviados de al menos una de las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína (proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3) desplegarán porcentajes de citocompatibilidad distinto al de las células libres de lixiviados o variante con el tiempo, con un nivel de confianza del 95%.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los porcentajes de citocompatibilidad de mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína empleadas como medicación intraconducto por ensayos *in vitro* a distintos tiempos y establecer una comparación estadística entre ellos.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3, manteniendo constante el peso del hidróxido de calcio.
2. Obtener muestras de lixiviados a partir de la incubación de OD tratados con las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en condiciones fisiológicas simuladas.
3. Evaluar la citocompatibilidad de las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína después de la exposición directa de sus lixiviados a células en cultivo a 24 y 48 h, a través de ensayos ELISA de acuerdo a la norma ISO:10993.
4. Evaluar el pH de las mezclas resultantes tras su inmersión en agua destilada durante 30 min, 1 h, 24 h, 7 y 14 días.
5. 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 celular en contacto con las muestras de lixiviados.
3. Tiempo de inmersión de mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en agua destilada.

7.2. VARIABLES DEPENDIENTES

1. Porcentaje de viabilidad celular.
2. Cambio de pH.

7.3. OPERACIÓN DE VARIABLES

A las diferentes mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3 se les evaluará la citocompatibilidad y cambio de pH mediante ensayos *in vitro*. Se evaluará la citocompatibilidad de las muestras de lixiviados obtenidos de cada una de las mezclas/medicamentos de manera cualitativa y cuantitativa a las 24 y 48 h a través de ensayos de microscopia óptica (morfología celular) y mediante ensayos ELISA (porcentaje de citocompatibilidad). El cambio de pH de las diferentes muestras será evaluado tras su inmersión en agua destilada durante 30 min, 1 h, 24 h, 7 y 14 días empleando tiras medidoras de pH.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. TIPO DE ESTUDIO

Experimental

8.2. UNIVERSO DE ESTUDIO

Para las pruebas de citocompatibilidad se trataron con medicación intraconducto 18 OD unirradiculares extraídos y fueron divididos en tres Sistemas, dos Controles y un Blanco (n=3):

Sistema 1: OD tratados con mezcla de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporción 1:0.3.

Sistema 2: OD tratados con mezcla de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporción 1:0.6.

Sistema 3: OD tratados con mezcla de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporción 1:1.

Control 1: OD tratados con $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Control 2: OD tratados con NAC.

Blanco: OD sin tratamiento.

Para la caracterización de pH se evaluaron 5 grupos (n=2):

Grupo 1: Pasta de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporción 1:0.3 en agua destilada.

Grupo 2: Pasta de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporción 1:0.6 en agua destilada.

Grupo 3: Pasta de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína en proporción 1:1 en agua destilada.

Grupo 4: Pasta de Ca(OH)_2 en agua destilada.

Grupo 5: Pasta de NAC en agua destilada.

8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL

La NAC fue adquirida de Sigma-Aldrich. El Ca(OH)_2 en polvo fue de la casa comercial Viarden (México). Para estandarizar los OD se utilizó regla milimétrica (Valdi) y disco de diamante montado en un motor de baja velocidad (Dremel 100-N/7). Para conformar e irrigar los OD se emplearon motor endodóntico Xmart Plus (Densply, México), limas rotatorias Protaper Gold (Densply, México), regla endodóntica, NaOCl al 2.5% (Cloralex), agua destilada, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 17% (Metabiomed), agujas de salida lateral y para activación del irrigante activador sónico EQ-S (Metabiomed). Para trabajar en condiciones de esterilidad se empleó una cabina de flujo laminar (Ulbrecht). Para la colocación de la medicación al conducto se utilizó motor endodóntico Xmart Plus (Densply, México), lima rotatoria F3 Protaper Gold (Densply, México), loseta de vidrio, espátula de cemento, torundas de algodón estériles. Para el sellado de la entrada del conducto se empleó resina de barrera gingival (Opaldam, Ultradent) y lámpara de fotocurado de luz LED inalámbrica de 5W. Para la producción de muestras de lixiviados se empleó medio de cultivo celular (DMEM, Sigma-Aldrich), se utilizó un agitador de vaivén con temperatura controlada (Shel Lab). Para la evaluación de la citocompatibilidad se empleó la línea celular MDA-MB-231 adquiridas en los laboratorios American Type Culture Collection (ATCC), placas de cultivo celular de 96 pocillos (Costar, USA), incubadora modelo Symphony de la marca VWR. Para la fijación celular, se utilizó glutaraldehído al 11%, cristal violeta al 0.1% compuesto por 0.1 g de cristal violeta en 100 mL de tampón el cual estaba compuesto por: ácido fosfórico 200 mM, ácido fórmico 200 mM y ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) 200 mM a pH 6., agua destilada, ácido acético al 10% y agitador orbital (Rotomix Type 48200), para la evaluación de la morfología celular se empleó un microscopio (Olympus CKX53), para los ensayos ELISA

se empleó un lector de placas (iMark, BIO-RAD). Para evaluar el cambio de pH de las mezclas se empleó agua destilada, tiras medidoras de pH (pH Universal teste strip) para homogenizar las muestras se empleó un agitador vortex (Vortex-2 gene digital, Scientific industries). Para estandarizar los pesos de las muestras de interés se empleó una microbalanza analítica de la marca Ohaus.

8.4. METODOLOGÍA

8.4.1. Preparación de las muestras

8.4.1.1. Conformación de los OD

Un total de 18 OD (incisivos superiores permanentes humanos extraídos) unirradiculares con conducto recto y ápice maduro (Figura 4) se decoronaron utilizando un disco de diamante con motor de baja velocidad. La longitud de las raíces fue estandarizada a 15 mm (Figura 5).

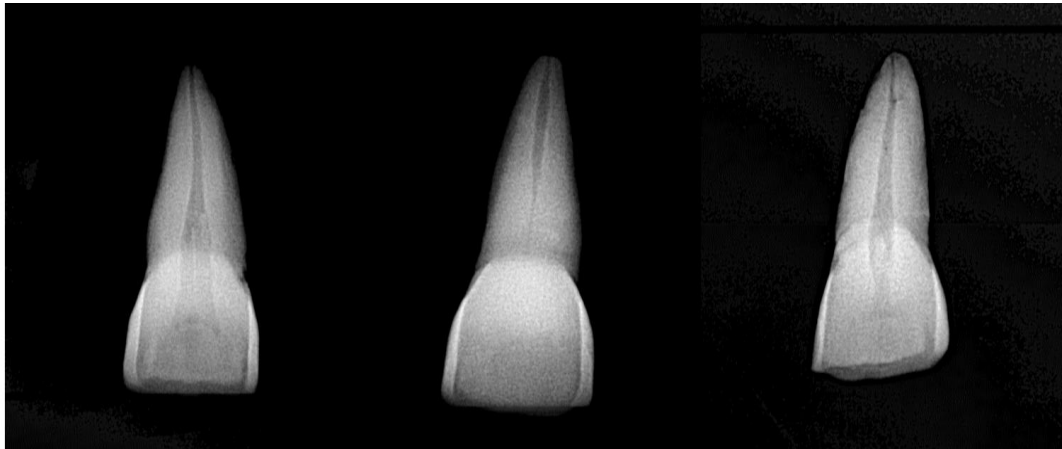


Figura 4. Radiografías iniciales de los OD.

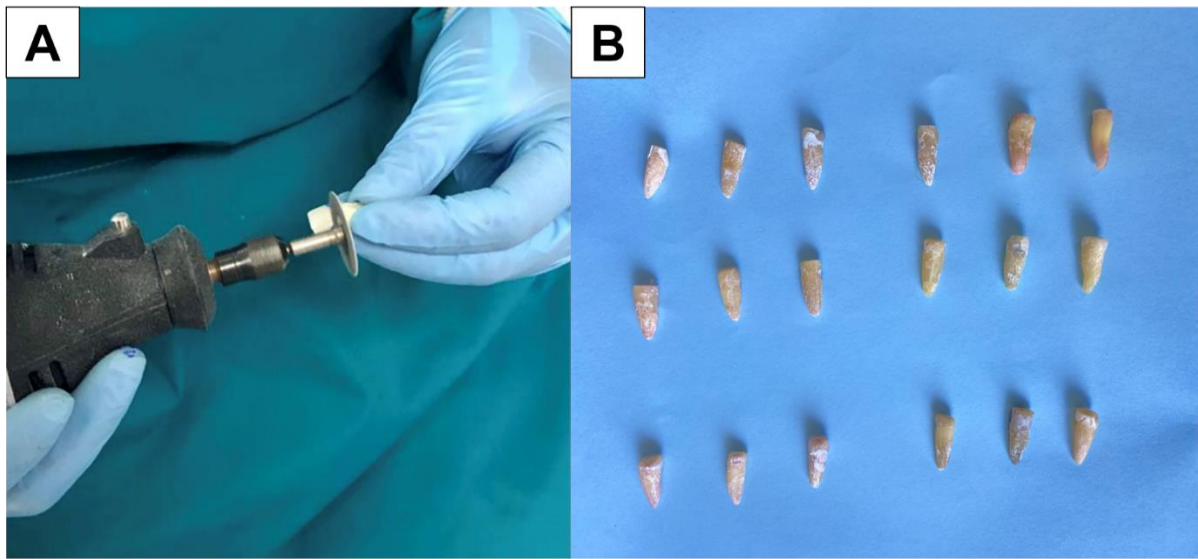


Figura 5. Estandarización de la longitud de los OD.

Para determinar la longitud de trabajo se introdujo una lima tipo K #15 hasta que se hiciera evidente en el foramen apical, a la longitud resultante se le resto 1 mm. Los conductos radiculares se prepararon empleando el sistema rotatorio ProTaper Gold hasta el instrumento F3. Los conductos se irrigaron con 1 ml NaOCl al 2.5% entre cada cambio de instrumento. Como irrigación final se emplearon 5 ml de NaOCl, realizando una activación sónica de 3 ciclos durante 30 s cada uno, posteriormente se depositaron 5 ml de agua destilada durante 1 min sin activación para continuar con la irrigación de 2 ml de EDTA al 17% durante 1 min y finalmente 5 ml de agua destilada durante 1 min para eliminar la capa de debris (Figura 6).

Todos los OD se introdujeron en bolsas de esterilizar individualmente para su esterilización en autoclave a 121 °C por 30 min.

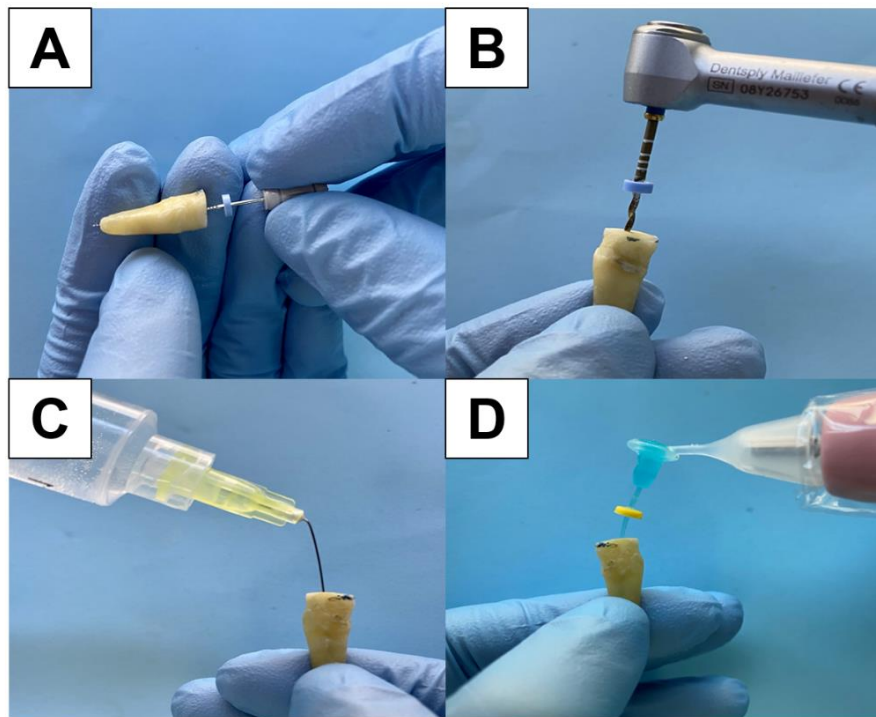


Figura 6. Conformación de los OD.

En el panel (A) se observa la determinación de longitud de trabajo, en el panel (B) se muestra la conformación del conducto radicular hasta el instrumento F3, en el panel (C) se observa la irrigación del conducto y en el panel D) se observa la activación del irrigante.

8.4.1.2. Preparación de las mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína y tratamiento de los OD

Las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$:NAC se prepararon en proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3, manteniendo la concentración de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ constante a 207.9 mg. Para realizar las mezclas los granos de NAC fueron triturados con espátula de cemento en loseta de vidrio hasta obtener un polvo fino, posteriormente fue mezclado con el polvo de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hasta que la mezcla de los polvos fuera homogénea; a esta mezcla se le añadió agua destilada estéril gradualmente en pequeñas alícuotas hasta obtener una consistencia de pasta (ca. 175 μl).

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el tratamiento de los OD las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC en las diferentes proporciones fueron colocadas como medicación intraconducto empleando un motor endodóntico con un instrumento F3 en modo “reversa” y atacadores para empacar de manera uniforme el material en todo el conducto radicular (Figura 7). Para mantener la consistencia de pasta de las mezclas era necesario ir agregando agua destilada estéril. Una vez obturados los OD se limpiaron con gasas estériles ligeramente húmedas para eliminar cualquier residuo de la medicación.

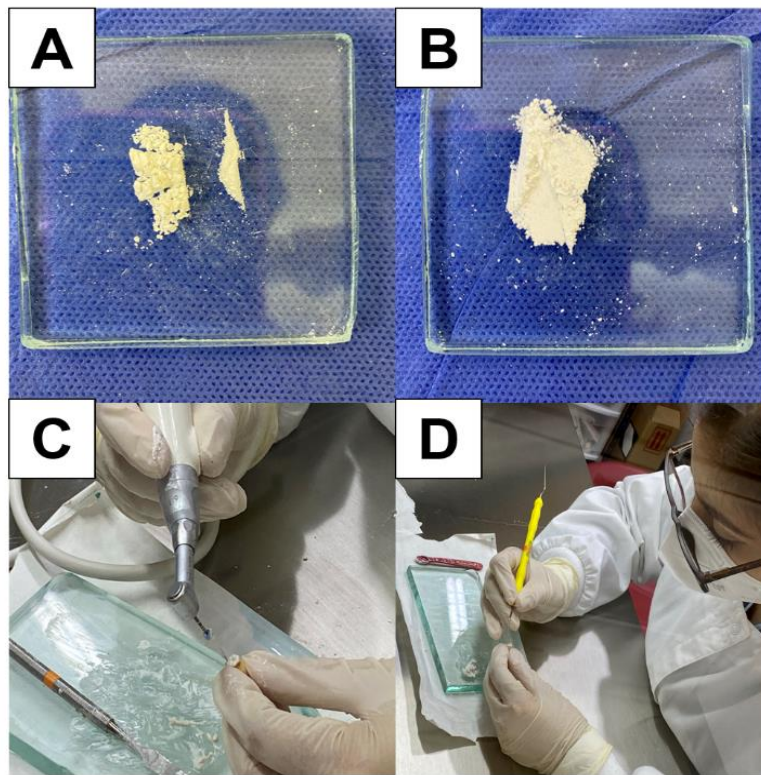


Figura 7. Preparación y colocación de las mezclas hidróxido del calcio:N-acetilcisteína como medicación intraconducto a los OD.

En la Figura se observa de izquierda a derecha el polvo de Ca(OH)_2 y NAC (A); los polvos de Ca(OH)_2 y NAC mezclados de forma homogénea (B); la obturación del conducto radicular con las mezclas empleando un instrumento F3 en sentido “reversa” (C); el empleo del atacador para empacar el material en el conducto (D).

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Después del tratamiento de los OD, se empleó una espátula de cemento y gasas secas para asegurar la completa eliminación de la medicación adherida a la superficie exterior de los OD. Posteriormente, se colocó resina de barrera gingival en toda la superficie oclusal para sellar por completo la entrada del conducto radicular (Figura 8). Para asegurar la completa esterilidad de los OD después de su manipulación fueron sumergidos en 3 ml de etanol 70% durante 10 min en tubos falcon estériles (15 ml) (Figura 9). Toda la experimentación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en el interior de una cabina de flujo laminar.

Finalmente, con el objetivo de confirmar el llenado completo del conducto radicular con la medicación intraconducto, los OD se introdujeron en bolsas estériles para realizar la toma de radiografías. Las radiografías fueron adquiridas en sentido mesio-distal y vestíbulo-palatino (Figura 10).

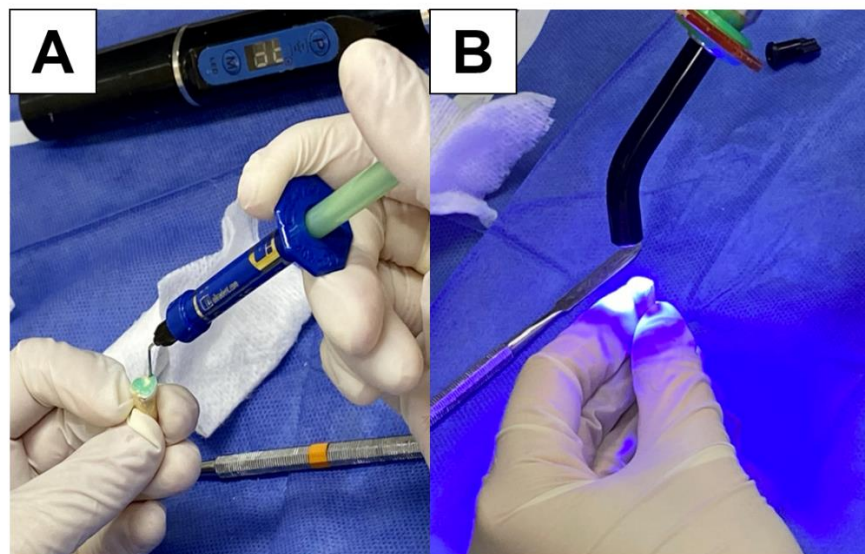


Figura 8. Sellado de la entrada del conducto radicular con resina gingival.

En la Figura se muestra A) la colocación de la barrera gingival en la parte oclusal del órgano dentario y B) la fotopolimerización de la barrera gingival empleando una lámpara de fotocurado.

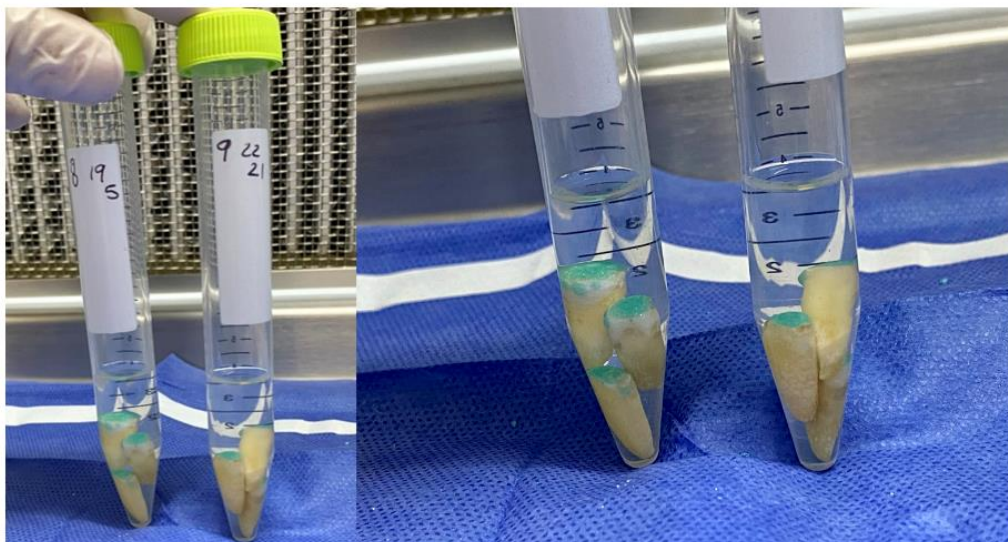


Figura 9. Esterilización de los OD en etanol al 70%.

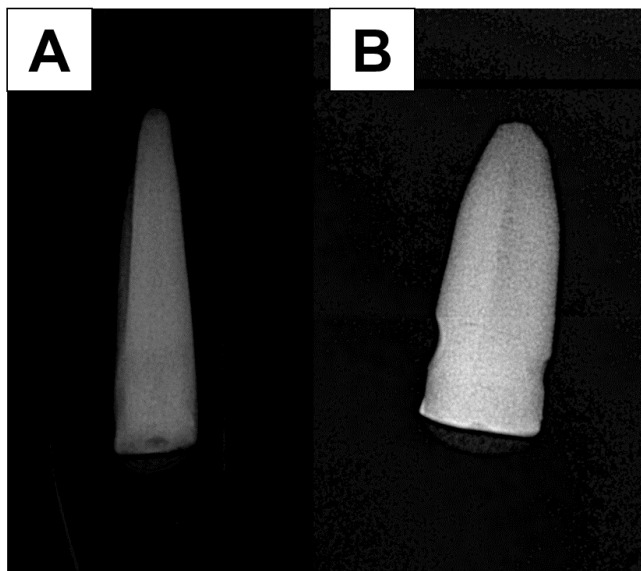


Figura 10. Radiografías de OD con la medicación intraconducto.

Se muestra en las radiografías un OD obturado con la mezcla hidróxido de calcio:N-acetilcisteína 1:0.3. A) radiografía en sentido vestibulo-palatino y B) radiografía en sentido mesio-distal. En ambas tomas se aprecia la ausencia de luz de conducto.

8.4.2. Obtención de muestras de lixiviados de los Sistemas de estudio en condiciones fisiológicas simuladas

Los OD tratados con las diferentes mezclas de Ca(OH)_2 :NAC como medicación intraconducto fueron sumergidos en 3 ml de medio de cultivo celular de forma individual en el interior de tubos falcon estériles (15 ml) cerrados y sellados con Parafilm (Figura 11). Para la obtención de las muestras de lixiviados, los tubos con los Sistemas de estudio fueron sometidos a un proceso secuenciado de incubación dinámica y estática. Primeramente, se procedió con una incubación dinámica controlada de 70 rpm en un agitador de vaivén a 37 °C durante 96 h (Figura 12). Transcurridas las 96 h de incubación dinámica (Figura 13), las muestras de lixiviados fueron trasvasadas a nuevos tubos falcon estériles para completar 120 h adicionales de incubación estática (en reposo) a la misma temperatura de 37 °C (Figura 14).

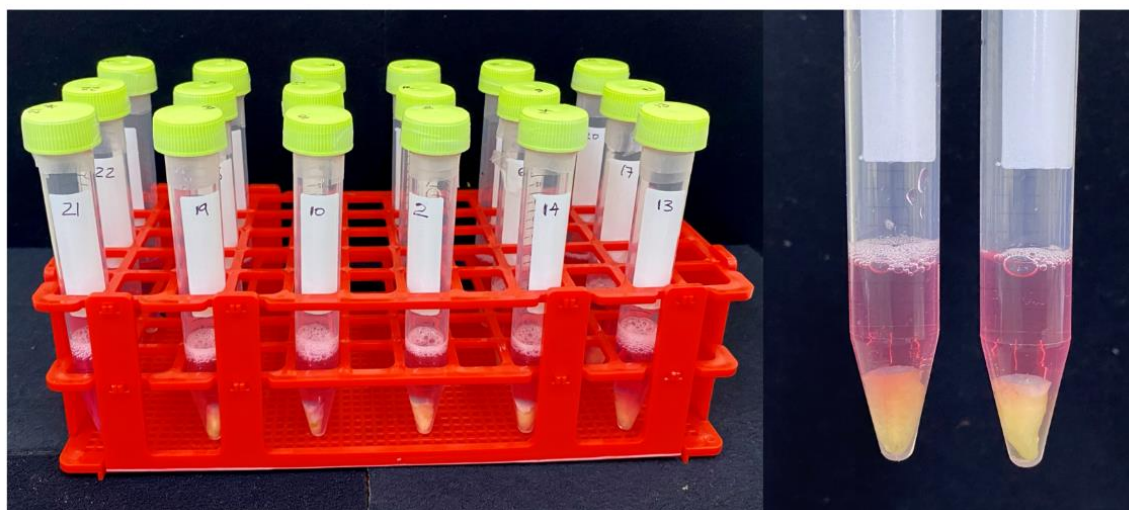


Figura 11. OD sumergidos en medio de cultivo celular.

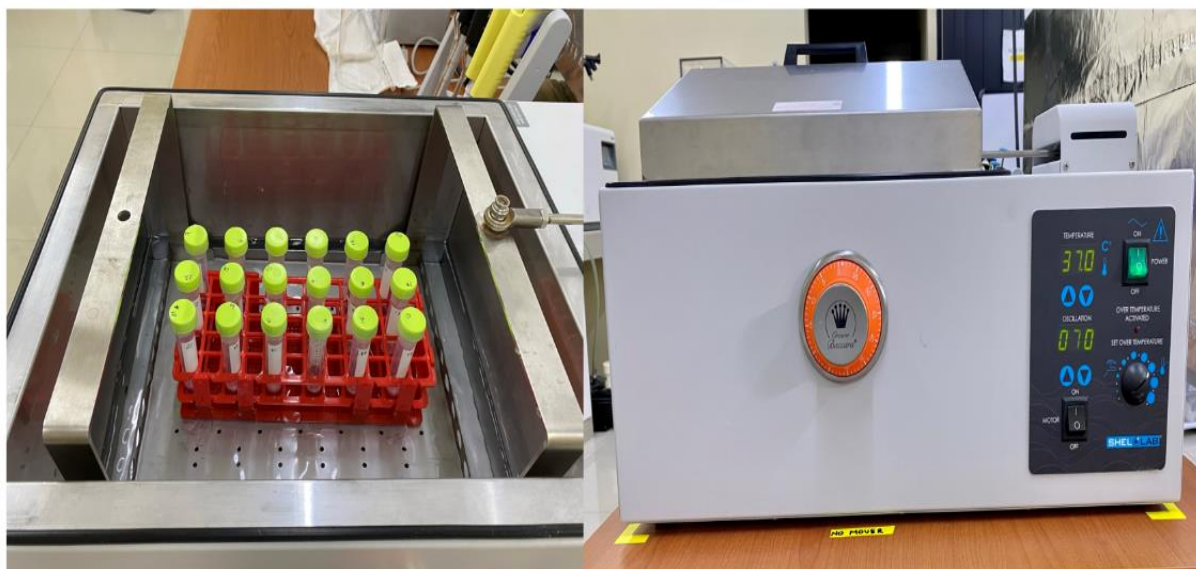


Figura 12. Producción de muestras de lixiviados en incubación dinámica controlada en un agitador de oscilación de vaivén a una oscilación de 70 rpm y 37 °C durante 96 h.

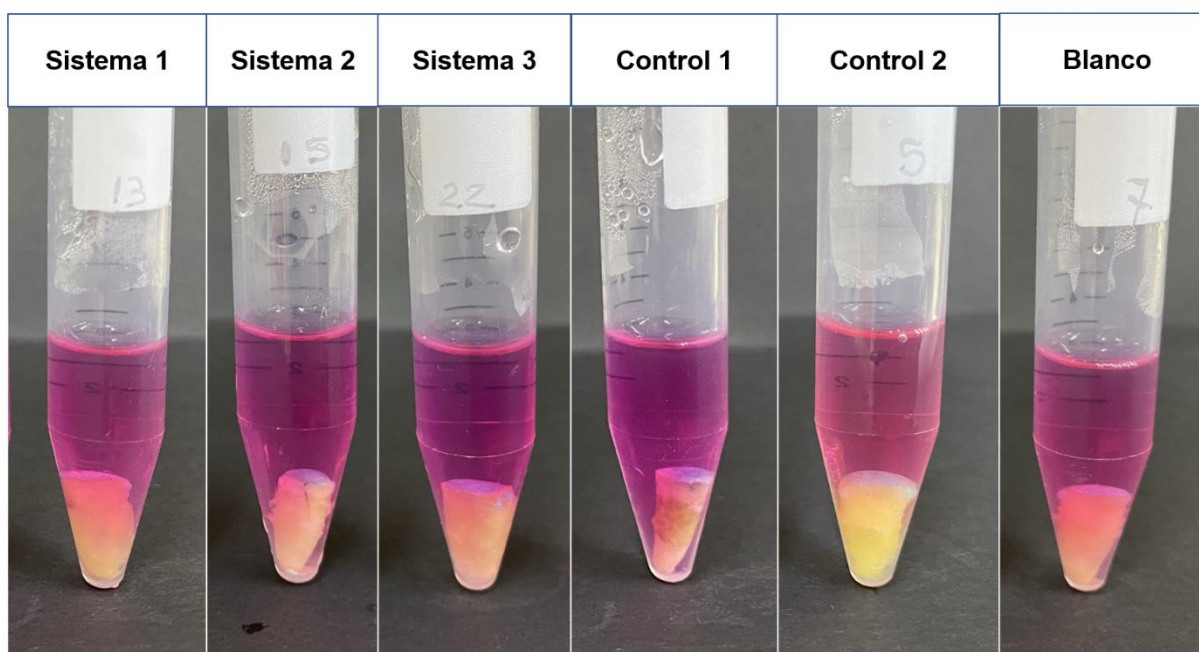


Figura 13. Tubos falcon con OD en el seno del medio de cultivo celular después de 94 h de incubación dinámica.

En la Figura se muestran fotografías de los sistemas 1-3, los Controles 1 y 2 y el Blanco sumergidos en medio de cultivo celular después de 94 h de incubación dinámica. En los OD se puede observar que no hubo desprendimiento de la barrera gingival de la superficie oclusal, por lo que se confirma el completo sellado de la entrada del conducto radicular durante el periodo de incubación dinámica.

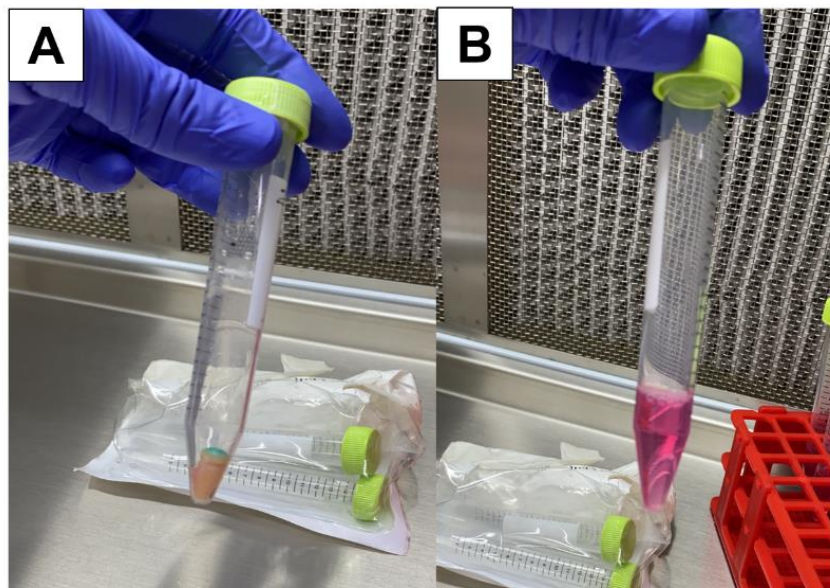


Figura 14. Trasvasado de muestras de lixiviados producidos de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC

En la Figura se observa A) el Sistema en el interior de tubo falcon después del trasvasado de las muestras de lixiviados y B) muestra de lixiviados en tubo falcon estéril nuevo.

8.4.3. Incubación celular en presencia de las muestras de lixiviados

Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en ingles), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 2 mM de L-Glutamina (L-Glu), 1 mM piruvato de sodio y 1% de penicilina-estreptomicina (pen-strep) e incubadas a condiciones estándar de cultivo (37 °C, 5% CO₂, atmósfera húmeda). Las células fueron subcultivadas al alcanzar una confluencia óptica del 80–90%. Para su subcultivo, las células confluentes fueron

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

tratadas con una solución 0.25% de tripsina-EDTA e incubadas por 4 min a condiciones estándar de cultivo. Las células fueron desprendidas de los frascos de cultivo, resuspendidas en medio de cultivo fresco y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 15,000 células/pocillo en 100 μ l de medio de cultivo/DMEM-suplementado e incubadas por 24 h en condiciones de cultivo (Figura 15) las células cultivadas fueron evaluadas bajo microscopia óptica para asegurar su viabilidad (Figura 16). Transcurridas las 24 h a las células se le añadieron 100 μ l de muestras de lixiviados de cada uno de los Sistemas de estudio a cada pocillo (n=6) (Figura 17). y fueron incubadas en presencia de las muestras de lixiviados durante 24 y 48 h en condiciones de cultivo celular (Figura 18).

Después de 24 y 48 h de incubación celular en presencia con las muestras de lixiviados, las células fueron observadas bajo microscopia óptica para evaluar nuevamente su morfología celular.

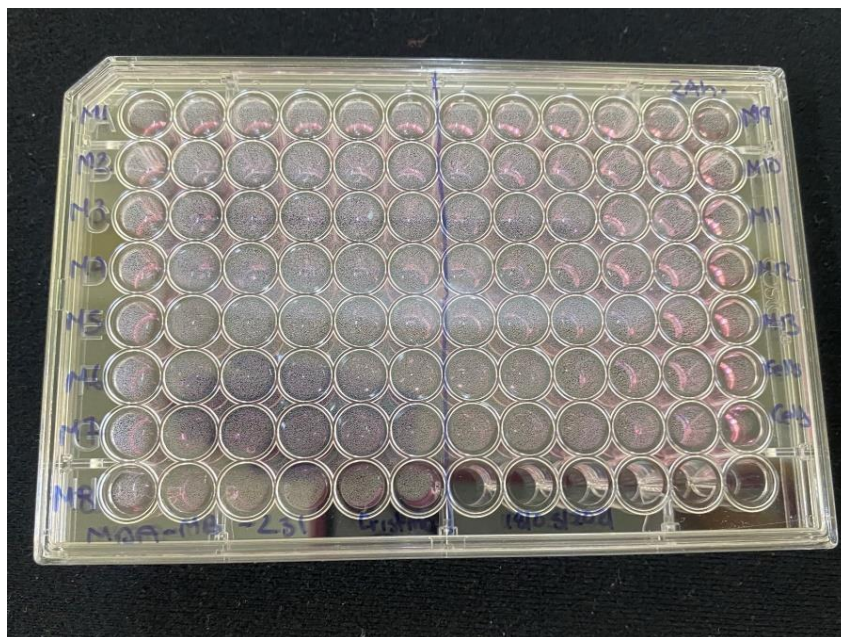


Figura 15. Placa celular con células en pocillos (densidad de 15,000 células/pocillo).

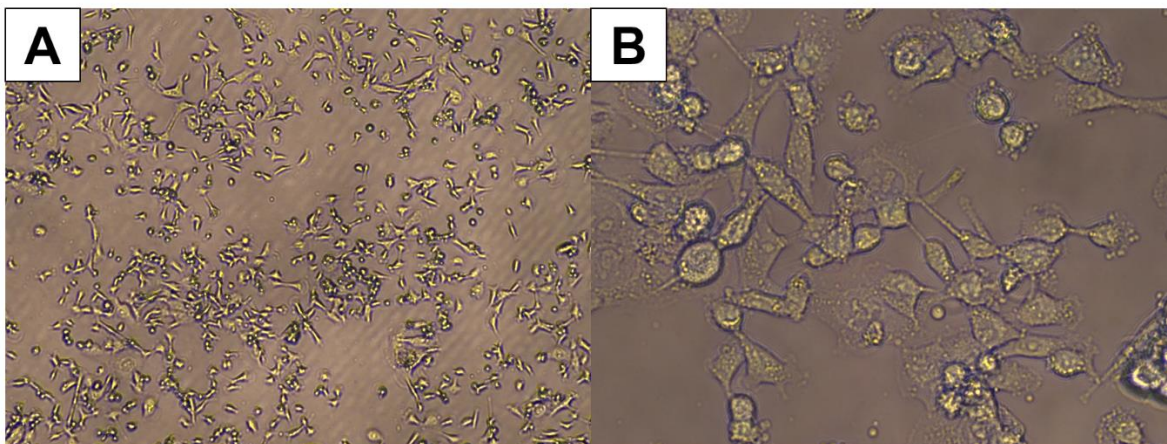


Figura 16. Micrografías bajo microscopio óptico de la línea celular MDA-MB-231.

En la Figura se observan micrografías de A) células en un aumento de 4x y B) de 20x.

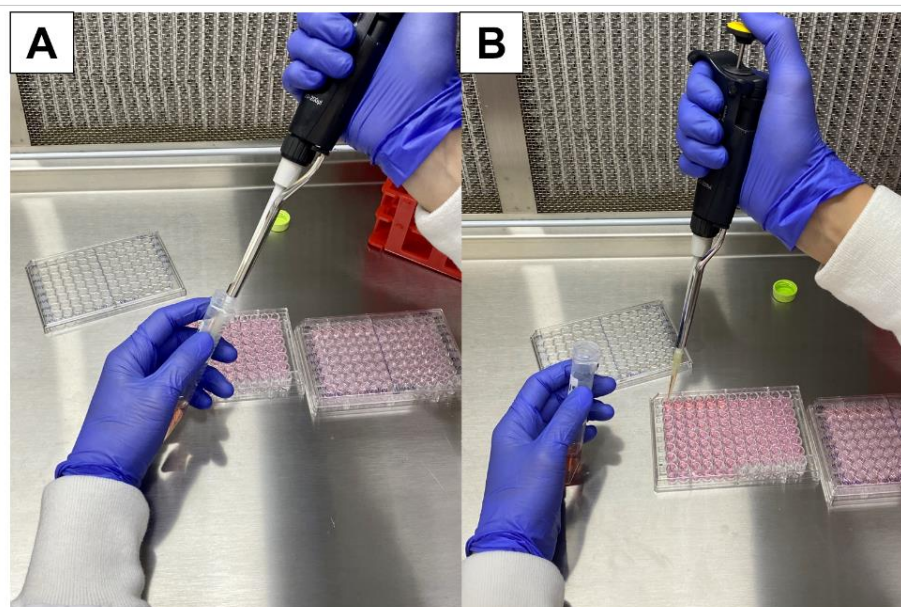


Figura 17. Depósito de muestras de lixiviados a pocillos de placas de cultivo con células.

En el panel A) se observa la toma con micropipeta de 100 μ l de muestra de lixiviados; en el panel B) se observa la colocación de 100 μ l de muestra de lixiviados a cada pocillo de placa celular con células adheridas.

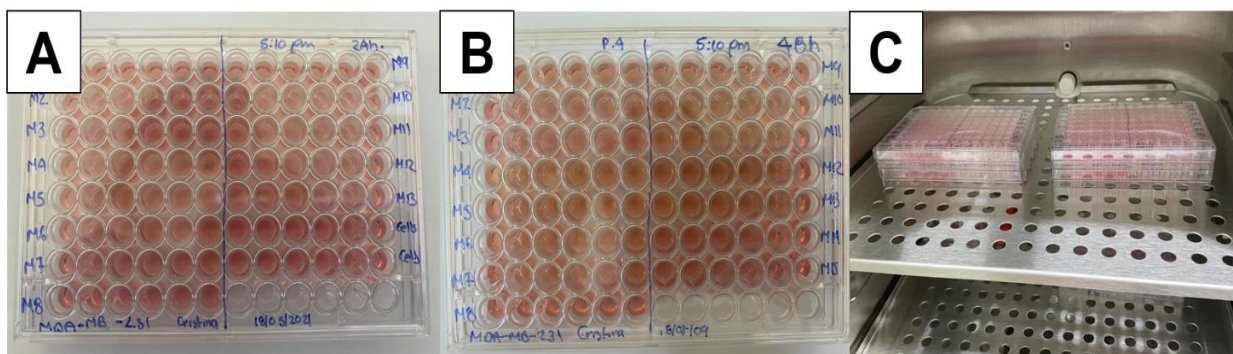


Figura 18. Incubación celular en presencia de lixiviados a 24 y 48 h.

En la Figura se muestra A) la placa celular con las muestras de lixiviados en contacto con células para su observación a 24 y B) 48 h; D) placas dentro de incubadora.

8.4.4. Evaluación de la citocompatibilidad a través de ensayos ELISA

Para llevar a cabo la evaluación de la citocompatibilidad, transcurridas las 24 y 48 h de incubación de las muestras de lixiviados con las células, se aspiró la totalidad del medio de cultivo y se agregaron 10 μ L de glutaraldehído al 11%, manteniéndolo bajo agitación orbital durante 15 min a temperatura ambiente, para fijar las células a la placa de 96 pocillos (Figura 19). Transcurrido este tiempo se aspiró el glutaraldehído de las células y se lavaron dos veces con agua destilada. Posteriormente, se procedió a la tinción de las células con 100 μ L de cristal violeta al 0.1%, manteniéndolo bajo agitación orbital durante 15 min a temperatura (

Figura 20). Transcurrido este tiempo se retiró la solución de cristal violeta de las células y se lavaron dos veces con agua destilada para remover el excedente de cristal violeta. Finalmente, las placas con las células teñidas se dejaron a temperatura ambiente durante 12 h en condiciones de oscuridad para permitir el completo secado de los pocillos.

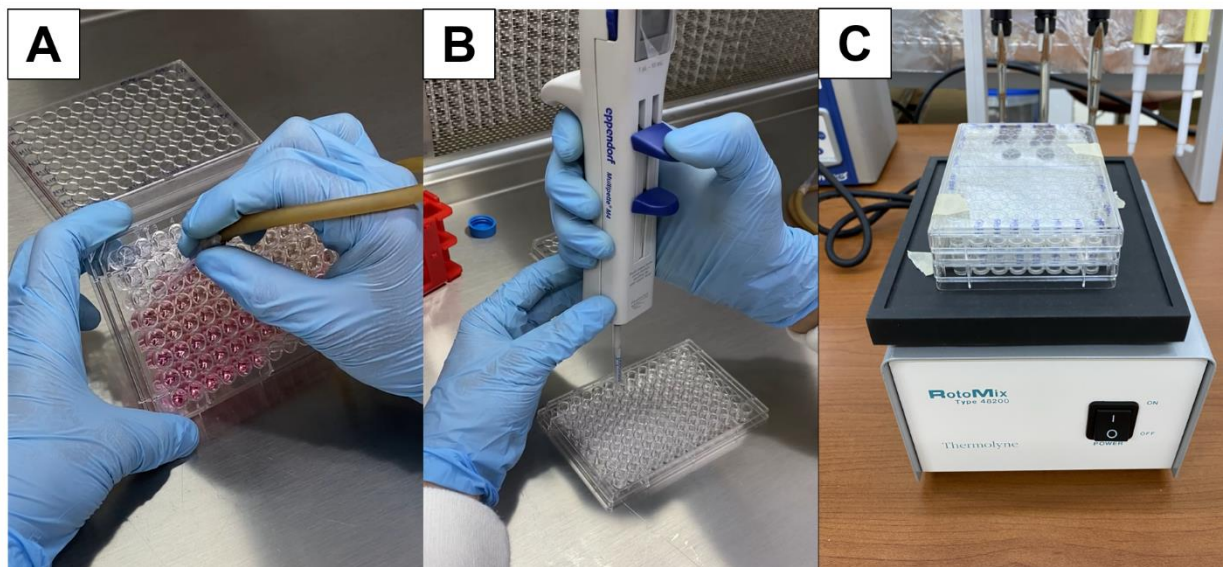


Figura 19. Fijación celular con glutaraldehído al 11%.

En la Figura se muestran fotografías de A) la aspiración del medio de cultivo que contenía las muestras de lixiviados, B) la adición de 10 µl de glutaraldehído al 11% por cada pocillo y C) las placas de 96 pocillos en el agitador orbital.

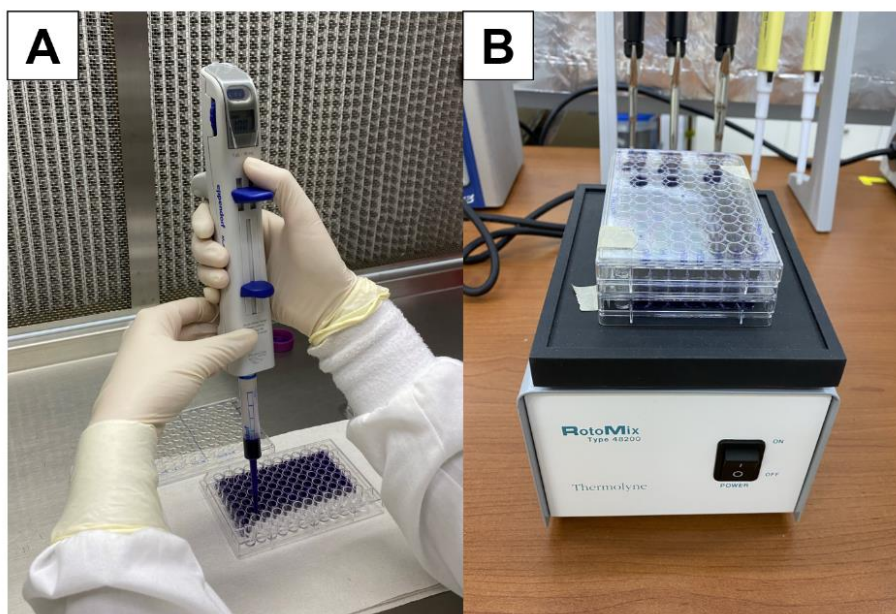


Figura 20. Tinción de células con cristal violeta al 0.1%.

En la Figura se muestran fotografías de la A) adición de 100 µl de cristal violeta al 0.1% por cada pocillo y C) las placas de 96 pocillos en el agitador orbital.

Posteriormente, para disolver el cristal violeta adherido a las células se añadieron 100 µL de ácido acético al 10% manteniéndolo bajo agitación orbital durante 15 min a temperatura ambiente (Figura 21). Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia de las muestras empleando un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 595 nm (Figura 22).

El porcentaje de citocompatibilidad de los Sistemas de estudio se calculó a través de la siguiente expresión:

Ecuación 1. Citocompatibilidad (%).

$$\text{Citocompatibilidad (\%)} = \frac{\text{Absorbancia de células expuestas a lixiviados}}{\text{Absorbancia de células no expuestas}} \times 100$$

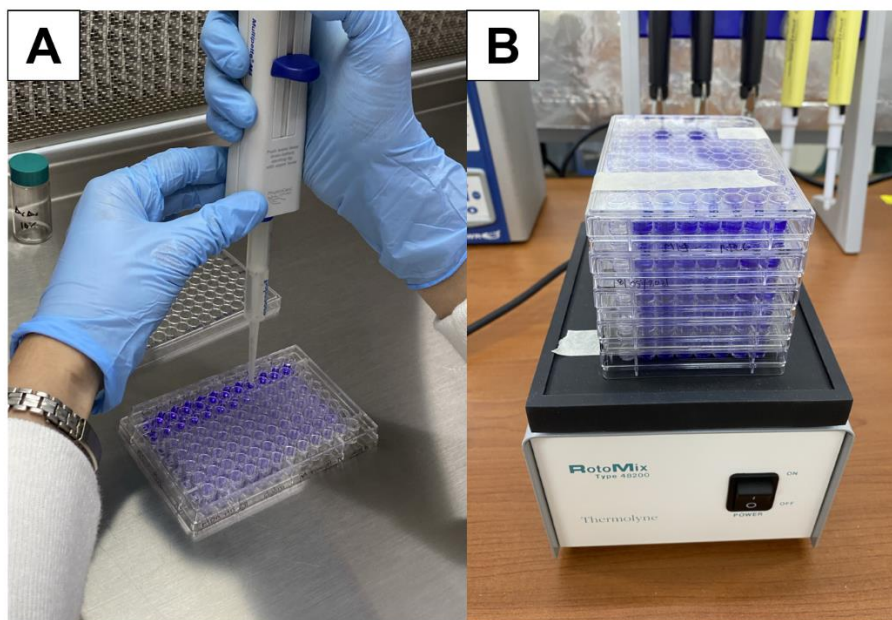


Figura 21. Disolución de cristal violeta adherido a células.

En la Figura se muestran fotografías de la A) adición de 100 µl de ácido acético por cada pocillo y C) las placas de 96 pocillos en el agitador orbital.



Figura 22. Lectura de la absorbancia de las muestras en lector de placas ELISA.

8.4.5. Evaluación de la morfología celular por microscopia óptica

Para evaluar la morfología celular, las células fueron observadas por microscopia óptica a las 24 y 48 h, tanto previo a la aspiración de medio de cultivo que contenía las muestras de lixiviados, como posterior a la tinción celular con cristal violeta al 0.1%, empleando un microscopio óptico invertido a una magnificación de 4x y 20x.

8.4.6. Evaluación de pH de las mezclas/medicamentos de estudio

Para la evaluación de pH de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC en proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3, manteniendo la concentración de Ca(OH)_2 constante a 50 mg, primeramente, los granos de NAC fueron triturados con espátula de cemento en loseta de vidrio hasta obtener un polvo fino, posteriormente fue mezclado con el polvo de Ca(OH)_2 hasta que la mezcla de los polvos fuera homogénea. Se emplearon 50 mg de los polvos de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína y se le añadió ca. 30 µl de agua destilada estéril para obtener una mezcla con consistencia de pasta. Para evaluar el pH los medicamentos de forma individual (Ca(OH)_2 y NAC) se emplearon 50 mg que fueron mezclados con 30 µl

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

y 15 µl de agua destilada respectivamente hasta obtener una consistencia de pasta. Las pastas preparadas de mezclas/medicamentos se dejaron de 3 a 5 min en la loseta para permitir que solidificaran.

Finalmente, las mezclas/medicamentos de estudio fueron inmersas en tubos falcon (15 ml) con 3 ml de agua destilada. Los valores de pH fueron adquiridos a los tiempos de 30 min, 1 h, 24 h, 7 días y 14 días (Figura 23). Previo a la medición, cada muestra fue homogenizada mediante agitación suave por 30 s empleando un agitador Vórtex, la medición fue adquirida con tiras medidoras de pH que fueron inmersas en el seno del líquido que contenía las mezclas/medicamentos de estudio (Figura 24).

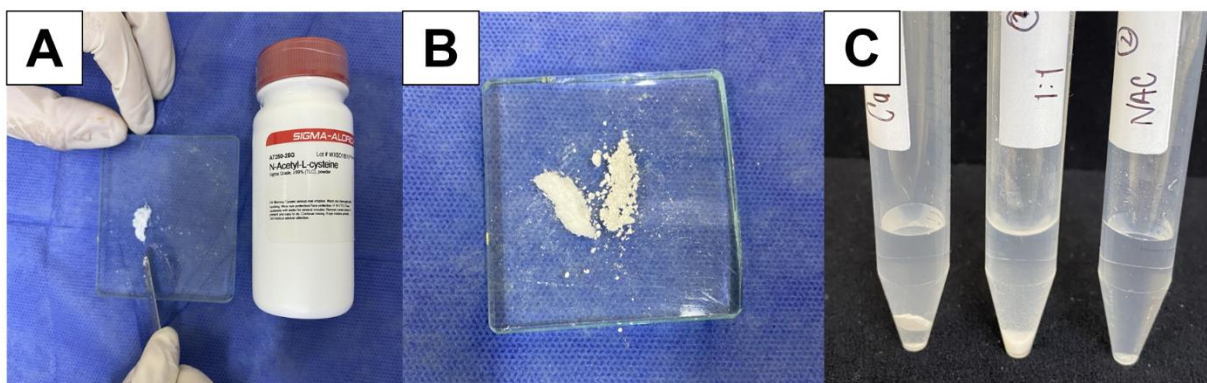


Figura 23. Preparación de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC para evaluación de pH.

En la Figura se observa de izquierda a derecha A) la trituration de los granos de NAC con espátula de cemento en loseta de vidrio, B) los polvos de NAC y Ca(OH)_2 listos para mezclarse de forma homogénea y C) mezcla/medicamentos de estudio inmersas en 3 ml de agua destilada.

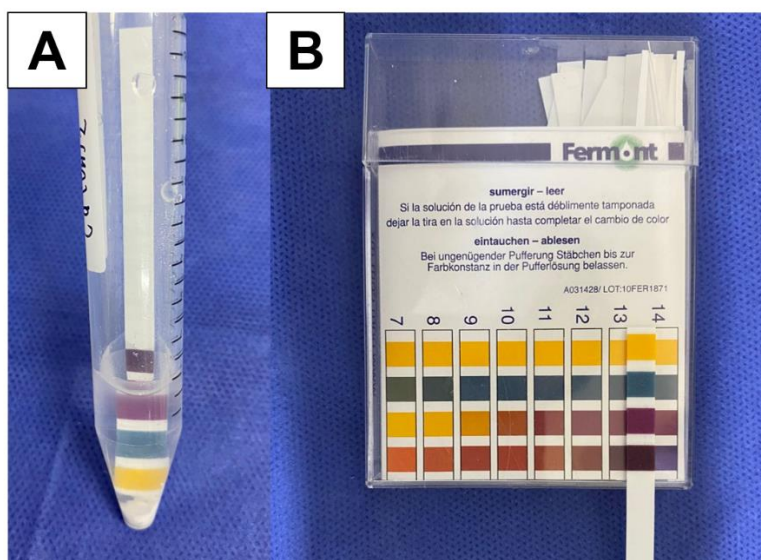


Figura 24. Medición de valores de pH de las mezclas/medicamentos de estudio.

En la Figura se muestra A) la tira medidora de pH inmersa en el seno del líquido con la muestra de estudio y B) comparación de la tira medidora con el color que se obtuvo con la de la escala de colores de pH para evaluar su pH.

8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando el método de Análisis de la Varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de una vía en conjunto con los métodos de post hoc Bonferroni y Tukey. La diferencia estadística fue considerada como significativa a $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

9.1. EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR POR MICROSCOPIA ÓPTICA A 24 Y 48 h

La morfología celular fue observada por microscopia óptica tras la exposición de células MDA-MB-231 a las muestras de lixiviados de las mezclas/medicamentos de estudio a 24 y 48 h de incubación. Para ello se empleó un microscopio óptico invertido con objetivos de 4x y 20x; las células fueron evaluadas de forma cualitativa inmediatamente después de su incubación en contacto con las muestras de lixiviados y posterior a la tinción celular con cristal violeta al 0.1%, los resultados se muestran en la Figura 25 y Figura 26.

A partir de las Figuras (Figura 25 y Figura 26) se puede observar que las células expuestas a los lixiviados de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC en proporciones 1:1, 1:0.6, 1:0.3, y medicamentos Ca(OH)_2 y NAC exhiben una morfología celular y proliferación sostenida similares a la presentadas por las células expuestas a los lixiviados del Blanco (OD sin tratamiento) y células libres de lixiviados. Estos resultados cualitativos confirman que no existió alteración celular tras la exposición a los diferentes tipos de mezclas/medicamentos, exhibiendo una alta citocompatibilidad a ambos tiempos de estudio (24 y 48 h). La citocompatibilidad observada al microscopio fue confirmada de manera cuantitativa por ensayos ELISA (ver Sección 9.2)

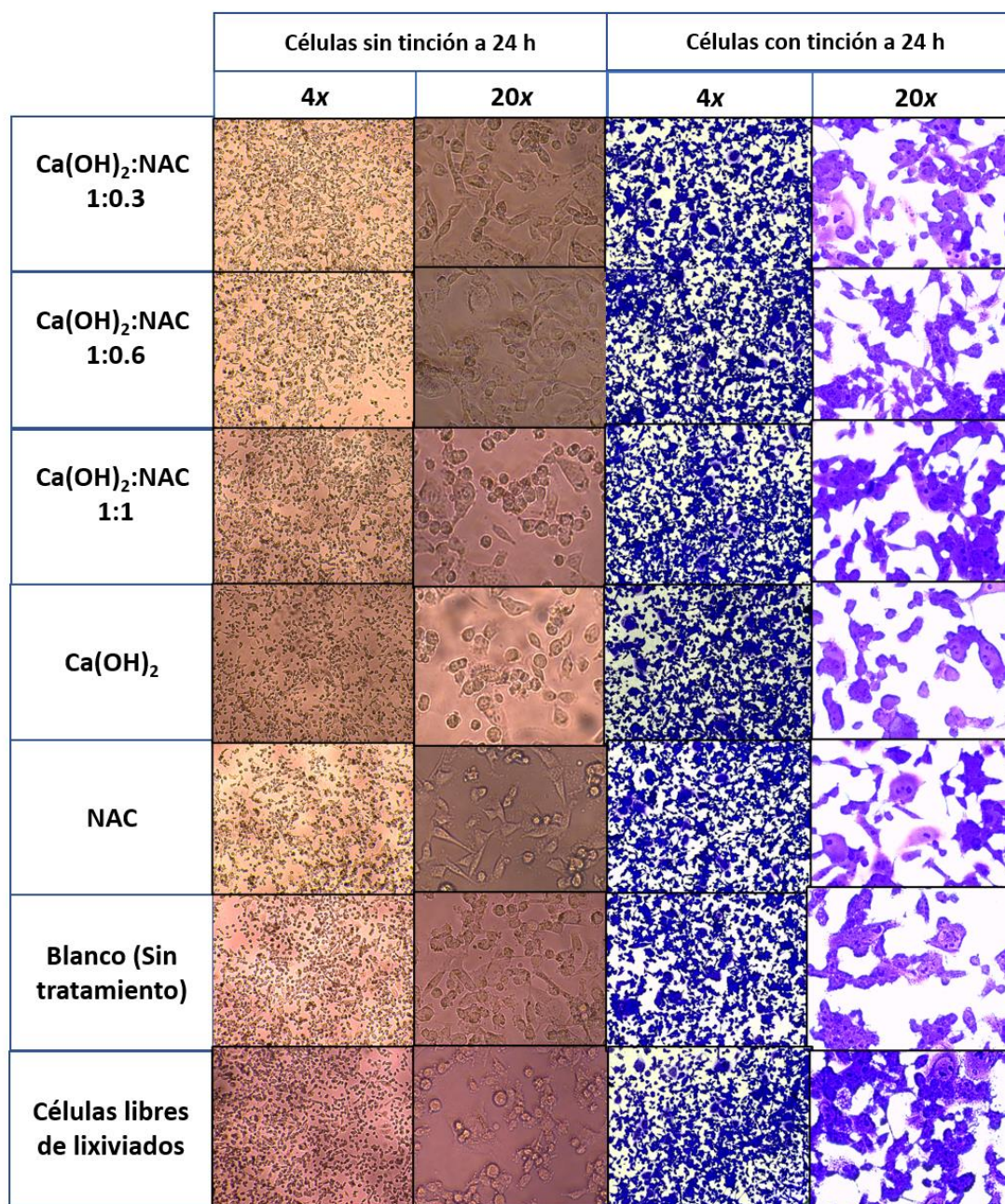


Figura 25. Morfología celular a las 24 h de incubación.

En la Figura se muestran de izquierda a derecha micrografías ópticas de células MDA-MB-231 a una magnificación de 4x y 20x sin tinción celular y teñidas con cristal violeta al 0.1% posteriores a las 24 h de incubación celular en contacto con los lixiviados de los Sistemas 1-3, Controles 1-2 y Blanco. En la última fila se muestran células sin tratamiento de lixiviados como punto de comparación

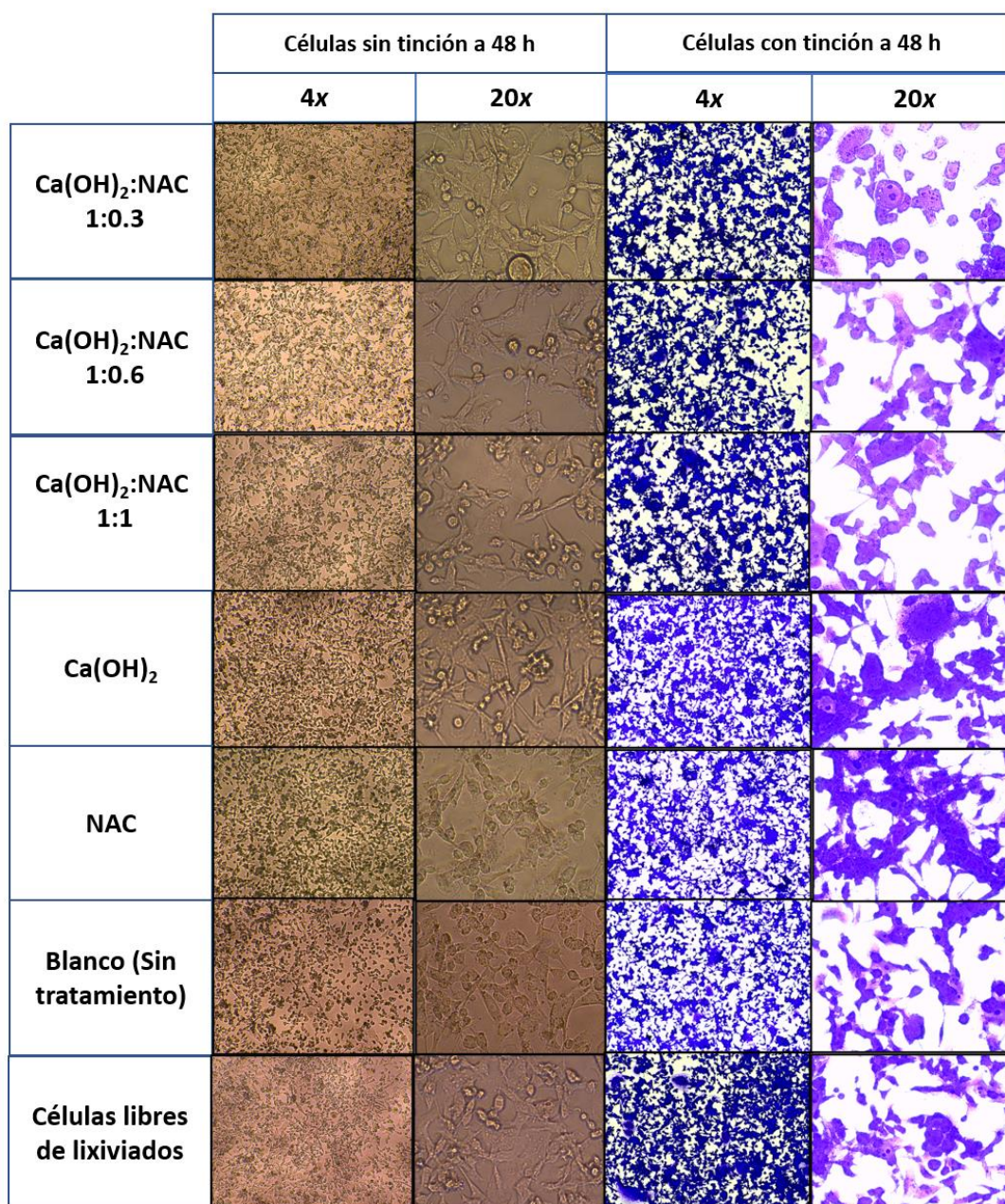


Figura 26. Morfología celular a las 48 h de incubación.

En la Figura se muestran de izquierda a derecha micrografías ópticas de células MDA-MB-231 a una magnificación de 4x y 20x sin tinción celular y teñidas con cristal violeta al 0.1% posteriores a las 24 h de incubación celular en contacto con los lixiviados de los Sistemas 1-3, Controles 1-2 y Blanco. En la última fila se muestran células sin tratamiento de lixiviados como punto de comparación.

9.2. EVALUACIÓN DE CITOCOMPATIBILIDAD POR ENSAYOS ELISA A 24 Y 48 h.

La citocompatibilidad de las mezclas/medicamentos de estudio se determinó por ensayos ELISA tras la exposición de las células MDA-MB-231 con las muestras de lixiviados durante 24 y 48 h en condiciones de cultivo celular estándar, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27.

A partir de la Figura 27 se puede observar que las células incubadas durante 24 h en presencia de muestras de lixiviados de las mezclas/medicamentos presentaron una viabilidad alta. En el caso de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC se observaron porcentajes de citocompatibilidad de 91%, 105% y 130% (proporciones 1:0.3, 1:0.6 y 1:1, respectivamente). En lo que respecta a los medicamentos por separado, se observaron porcentajes de citocompatibilidad de 114% y 130% (Ca(OH)_2 y NAC, respectivamente). De manera muy interesante, estos porcentajes de viabilidad celular alta se mantuvieron a las 48 h de incubación. Relativo a las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC se observaron porcentajes de citocompatibilidad de 78%, 83% y 105% (proporciones 1:0.3, 1:0.6 y 1:1, respectivamente). En lo que respecta a los medicamentos por separado, se observaron porcentajes de citocompatibilidad de 105% y 98% (Ca(OH)_2 y NAC, respectivamente). A partir de estos resultados, se puede confirmar que todas las mezclas/medicamentos de estudio pueden clasificarse como citocompatibles en virtud de que todas ellas exhiben niveles de viabilidad celular superiores al 70% (70).

Adicionalmente, se encontró que existe una relación entre el incremento de concentración de NAC de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC y el porcentaje de citocompatibilidad. Se puede observar que, a mayor proporción de NAC en las mezclas, éstas exhiben un mayor porcentaje de citocompatibilidad, que van del 91% al 130% y del 78% al 105% a 24 y 48 h de incubación, respectivamente.

Muy importante, el análisis estadístico de los resultados demostró que existe diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de citocompatibilidad entre la mezcla de Ca(OH)_2 :NAC en proporción 1:0.3 y la mezcla de Ca(OH)_2 :NAC en proporción 1:1 a las 24 h de incubación (Post-hocs de Bonferroni y Tukey, $p < 0.05$). Asimismo, se encontró

que existe diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de citocompatibilidad entre las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC en proporción 1:0.3 y la NAC a las 24 h de incubación celular (Post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Con base en lo anterior, se confirma la Hipótesis Alternativa (H1) en este trabajo de investigación.

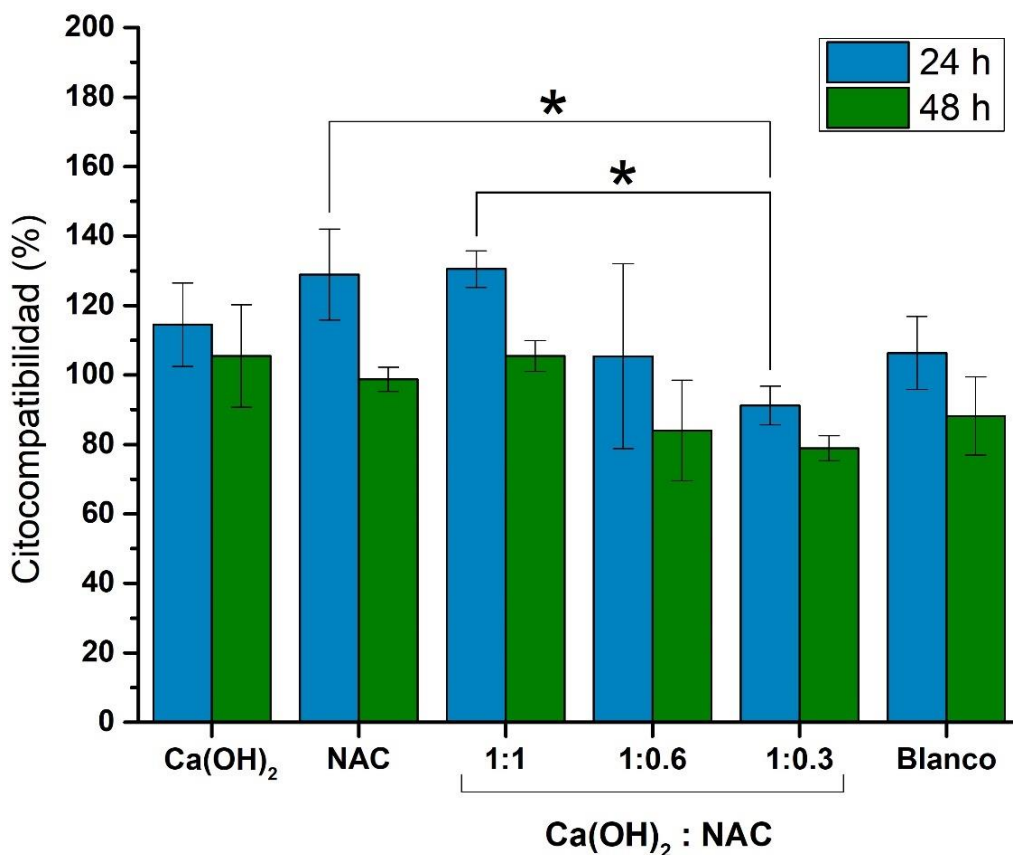


Figura 27. Porcentaje de citocompatibilidad de mezclas de hidróxido de calcio:N-acetilcisteína a las 24 y 48 h.

*Las columnas representan el promedio de los resultados obtenidos y las barras verticales representan la desviación estándar ($n=6$), de acuerdo con la Ecuación 1. * denota diferencia estadísticamente significativa entre las muestras comparadas ($p < 0.05$).*

9.3. EVALUACIÓN DE pH DE LAS MEZCLAS/MEDICAMENTOS DE ESTUDIO

Se determinaron los valores de pH de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC en proporciones 1:1, 1:0.3, 1:0.6 y medicamentos Ca(OH)_2 y NAC. Para ello se prepararon pastas estandarizadas a un peso de 50 mg. Las pastas fueron inmersas en 3 ml de agua destilada. Los valores de pH de las mezclas/medicamentos fueron medidos a los tiempos de 30 min, 1 h, 24 h, 7 días y 14 días a temperatura ambiente, empleando tiras medidoras de pH. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28

A partir de la Figura 28 se puede observar que las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC en proporciones 1:1, 1:0.3 y 1:0.6 exhibieron un pH de 12 a los 30 min, que incrementó hasta un pH de 13 el día 7, manteniéndose constante hasta el día 14. En lo que respecta a los medicamentos, el Ca(OH)_2 igualmente exhibió un pH de 12 a los 30 min, que incrementó hasta un pH de 13 el día 7, manteniéndose constante hasta el día 14; mientras que la NAC presentó un pH constante de 1 en todos los tiempos establecidos. A la luz de estos resultados, se valida que el carácter alcalino de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC (pH entre 12 y 13), requerido para su acción antibacteriana, se mantiene con el tiempo.

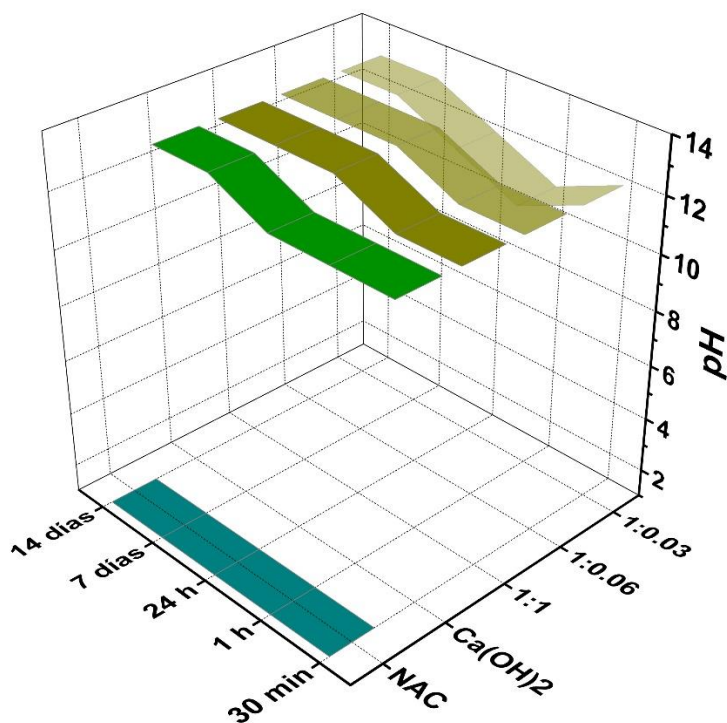


Figura 28. Valor de pH de las mezclas/medicamentos a distintos tiempos de incubación en agua destilada.

Las líneas representan los valores obtenidos de pH de las mezclas/medicamentos de estudio a los distintos tiempos de estudio.

X. DISCUSIÓN

El uso de medicamentos empleados como medicación intraconducto con buena citocompatibilidad y actividad antimicrobiana puede resultar en la eliminación de los organismos remanentes en el sistema del conducto radicular y aumento en la tasa de éxito del tratamiento de conductos (71). Por lo tanto, es fundamental desarrollar estrategias de desinfección eficaces y seguras en los procedimientos de medicación intraconducto. Aunque el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ muestra una excelente citocompatibilidad, la adición de otras sustancias puede afectar sus propiedades biológicas (72). En el presente estudio se evaluaron los porcentajes de citocompatibilidad de mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$:NAC en proporciones 1:1, 1:0.6, 1:0.3, y medicamentos $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y NAC los cuales exhibieron una viabilidad alta de alrededor del 78% y 130% en todos los casos de estudio, a las 24 y 48 h de incubación celular. Teniendo en cuenta la metodología utilizada en el presente estudio, nuestros hallazgos indican que las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$:NAC empleadas como medicación intraconducto son altamente citocompatibles. Esto se corrobora en la literatura donde Hernández-Ríos *et al.* han establecido que la NAC es un agente mucolítico antioxidante derivado del aminoácido L-cisteína. Como precursor del glutatión, la NAC puede incorporarse a las células y neutralizar los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) los cuales pueden ser producidos por las células fagocíticas en respuesta al desafío bacteriano en la periodontitis apical, disminuyendo así los efectos acumulativos del estrés oxidativo (73). Kim *et al.* en su estudio *in vitro* investigaron el efecto de NAC como fármaco antioxidante, sobre la citotoxicidad y la actividad anti-diferenciación de los adhesivos dentales de monómeros de resina y concluyeron que NAC fue útil para revertir la citotoxicidad y los efectos anti-diferenciación de Prime & Bond NT en las células de la pulpa dental humana (74).

Por otro lado, Karapinar *et al.* han propuesto la NAC como un agente terapéutico alternativo con potencial en el tratamiento del conducto radicular, puesto que, en su estudio, evaluaron los efectos pro y antiinflamatorios de la NAC y el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en líneas celulares de macrófagos humanos estimulados por lipopolisacáridos, en donde se concluyó que ambos materiales tienen un efecto antiinflamatorio igualmente fuerte, sin

embargo NAC reguló negativamente los niveles de proteína y gen de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) generando resultados exitosos en la prevención de la inflamación (75). Finalmente, Corazza *et al.* en su estudio revelaron que las resolvinas (Rv), un tipo de inmunoresolventes, que impulsan activamente la resolución de la inflamación aguda activando la cicatrización de heridas, con regeneración tisular. En particular las RvE1 y RvD2, juegan un papel importante en el proceso de la resolución de inflamación de los tejidos periapicales en infecciones endodónticas primarias y periodontitis apical. Los resultados demostraron que cuando se probó un agente terapéutico alternativo como la NAC mejoró significativamente los niveles de RvE1 y RvD2 en los tejidos periapicales (76). Por lo tanto, se confirma en este estudio que la alta citocompatibilidad de las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$:NAC en proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3 fueron resultantes como consecuencia a las propiedades de la NAC que promovieron un aumento en la proliferación celular.

En la medicación intraconducto el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se ha utilizado ampliamente por su actividad biológica y antimicrobiana, su capacidad para disolver tejido orgánico y por inactivar las endotoxinas bacterias. El $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ejerce efectos letales cuando está en contacto directo sobre las bacterias en forma de solución, en tales condiciones, la concentración de iones hidroxilo es muy alta, alcanzando niveles incompatibles con la supervivencia bacteriana. (71). El mantenimiento de un pH alto es importante para la acción antibacteriana del $\text{Ca}(\text{OH})_2$, aunque el *E. faecalis* no puede sobrevivir en un ambiente alcalino, este pH es difícil de mantener en el medio dentinario debido a varios factores. En primer lugar, el *E. faecalis* tiene la capacidad de mantener activa o pasivamente la homeostasis del pH intracelular a través de bombas de protones o protones de difusión pasiva a través de su membrana celular. En segundo lugar, la dentina es un buen sustrato que reduce eficazmente la extrema alcalinidad del hidróxido de calcio, reduciendo así sus efectos antibacterianos (46). Además, el *E. faecalis* tiene la capacidad de formar biopelículas bien organizadas que pueden resistir el proceso de curación e inducir la precipitación de hidroxiapatita en una biopelícula madura para formar una biopelícula calcificada (19).

La asociación de agentes antibacterianos al $\text{Ca}(\text{OH})_2$ juegan un papel importante en el proceso de disociación iónica para el mantenimiento de un pH alcalino y, por lo tanto, en

la desinfección del conducto radicular y la citocompatibilidad. En el presente estudio, las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC en proporciones 1:1, 1:0.6 y 1:0.3 exhibieron un pH alcalino (11-13) en los tiempos de 30 min, 1 h, 24 h, 7 días y 14 días, por consiguiente, estos resultados confirman que la asociación de NAC al Ca(OH)_2 no interfiere en la alcalinidad del Ca(OH)_2 . Esto se puede constatar en la literatura por el estudio realizado por Quah *et al.* donde estudiaron los efectos antibacterianos de NAC sobre la biopelícula de *E. faecalis*, en un ambiente alcalino, los resultados obtenidos de erradicación de biopelícula por NAC no se vieron afectados con la presencia de polvo de dentina cuando se mantuvo un pH de 13, incluso cuando se incubó hasta por 14 días.(69). Recientemente Olofsson *et al.* reportaron que los efectos positivos del tratamiento con NAC se han atribuido principalmente a sus propiedades de reducir la producción de polisacárido extracelular, alterando las biopelículas maduras y reduciendo la adhesión de las bacterias a las superficies, lo que resulta en la disminución significativa de infecciones bacterianas (77). Con base a la literatura se puede confirmar en el presente estudio que el carácter alcalino de las mezclas de Ca(OH)_2 :NAC, requerido para la acción antibacteriana, se mantuvo constante con el tiempo. Dichos hallazgos destacan a la NAC como un fármaco atractivo en combinación con el Ca(OH)_2 para emplearse como medicación intraconducto, debido a las propiedades mucolíticas que favorecen la actividad antimicrobiana del Ca(OH)_2 , aunado a las excelentes propiedades antioxidantes y regenerativas de la NAC

XI. CONCLUSIONES

10.1. EVALUACIÓN DE CITOCOMPATIBILIDAD POR ENSAYOS ELISA

Se llevó a cabo un estudio *in vitro* para evaluar los porcentajes de citocompatibilidad de mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{:NAC}$ tras el cultivo de células MDA-MB-231 en presencia de sus lixiviados por 24 y 48 h.

1. La morfología de las células expuestas a los lixiviados de las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{:NAC}$ confirman que no existió alteración celular a las 24 y 48 h exhibiendo una alta citocompatibilidad, similar a la presentada por las células cultivadas en ausencia de lixiviados.
2. Los ensayos ELISA demostraron que las células incubadas en presencia de lixiviados de las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{:NAC}$ en proporciones 1:1, 1:0.6, 1:0.3 y medicamentos $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y NAC, presentaron una viabilidad celular alta de alrededor de 78% y 130% en todos los casos a las 24 y 48 h.
3. Los resultados cuantitativos obtenidos exhibieron que existe una relación entre el incremento de concentración de NAC de las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{:NAC}$ y un mayor porcentaje de citocompatibilidad que van del 91% al 130% y del 78% al 105% a 24 y 48 h de incubación, respectivamente.
4. El análisis estadístico demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de citocompatibilidad de la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{:NAC}$ en proporción 1:0.3 con respecto a la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{:NAC}$ en proporción 1:1 y NAC (Control 2) a las 24 h de incubación ($p < 0.05$).
5. Con base a lo anterior se confirma la Hipótesis alternativa (H1) de este trabajo de investigación.

10.1. EVALUACIÓN DE pH

Se llevo a cabo la preparación de las pastas de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$ en las proporciones de 1:1, 1:0.6 y 1:0.3, las cuales fueron inmersas en agua destilada para evaluar posteriormente su pH a los 30 min, 24 h, 7 días y 14 días a temperatura ambiente empleando tiras medidoras de pH.

6. Se valido que el carácter alcalino de las mezclas de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$, requerido para su acción antibacteriana, se mantuvo constante con el tiempo, exhibiendo valores de pH de entre 12 y 13.

XII. RECOMENDACIONES

Como trabajo a futuro, se recomienda realizar estudios que evalúen la actividad antimicrobiana de las mezclas de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$ con enfoque en la erradicación del biofilm bacteriano de patógenos endodónticos.

Además, se recomienda ampliar la ventana de proporciones de medicamentos en las mezclas de $\text{Ca(OH)}_2\text{:NAC}$ con el objetivo de establecer las mejores condiciones de manipulación para aplicar, transportar y obturar el conducto radicular en su uso como medicación intraconducto.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. American association of endodontists [Internet]. [cited 2020 Mar 10]. Available from: <https://www.aae.org/>
2. Canalda Sahli C, Brau Agudé E. Endodoncia Técnicas clínicas y bases científicas. 3ra ed. Barcelona, España: Elsevier; 2014.
3. Bergenholtz G. Assessment of treatment failure in endodontic therapy. J Oral Rehabil. 2016;43(10):753–8.
4. Ingle, J. Beveridge E. Endodoncia. 2da edició. Mexico: Panamericana; 1979.
5. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. J Endod. 2008;34(11).
6. Cohen S. Vías de la pulpa. 10ma ed. Barcelona, España: Elsevier; 2011.
7. Malmberg L, Björkner AE, Bergenholtz G. Establishment and maintenance of asepsis in endodontics – a review of the literature. Acta Odontol Scand. 2016;74(6):431–5.
8. Siqueira Junior JF, Rôças I das N, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: Causes, clinical implications, and therapeutic strategies. Braz Oral Res. 2018;32:1–19.
9. Siqueira JF, Rôças IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. J Oral Microbiol. 2009;1(2009).
10. Sánchez Lara Tajonar R, Cámara Chejin LF, Feregrino Méndez M. Tratamiento endodóntico en una sola sesión como solución única, de una aparente lesión endoperio. Reporte de un caso clínico. Odontol Vital. 2017;(27):29–34.
11. Singh H. Microbiology of Endodontic Infections. J Dent oral Heal. 2016;2(5):2–5.

12. Bouillaguet S, Manoil D, Girard M, Louis J, Gaia N, Leo S, et al. Root microbiota in primary and secondary apical periodontitis. *Front Microbiol.* 2018;9(OCT):1–11.
13. Siqueira JF, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of Chemomechanical Preparation With 2.5% Sodium Hypochlorite and Intracanal Medication With Calcium Hydroxide on Cultivable Bacteria in Infected Root Canals. *J Endod.* 2007;33(7):800–5.
14. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal.* 2019;24(3):e364–72.
15. 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;7(2):1–15.
16. 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;32(2):93–8.
17. Rocas I, Siquera J, Santos K. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular. *J Endod* [Internet]. 2004;30(19):315–20. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
18. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: Host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine.* 2004;22(7):822–30.
19. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus.* 2020;12(3):1–10.
20. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;399–405.
21. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol.* 2007;56(12):1581–8.

22. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm Formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007;33(7):815–8.
23. Jhajharia K, Mehta L, Parolia A, Shetty Kv. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(1):1.
24. 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.
25. Kumar A, Tamanna S, Iftexhar H. Intracanal medicaments - Their use in modern endodontics: A narrative review. *J Oral Res Rev*. 2019;11:89–94.
26. Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial Efficacy of Chlorhexidine Gluconate Intracanal Medication In Vivo. *J Endod*. 2007;33(7):788–95.
27. Neelakantan P, Sanjeev K, Subbarao C V. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2007;104(4):138–41.
28. Vera J, Siqueira JF, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: A histobacteriologic study. *J Endod*. 2012;38(8):1040–52.
29. CHONG BS, FORD TRP. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J*. 1992;25(2):97–106.
30. Sakko M, Tjäderhane L, Sorsa T, Hietala P, Järvinen A, Bowyer P, et al. 2-Hydroxyisocaproic acid (HICA): A new potential topical antibacterial agent. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2012;39(6):539–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.02.006>
31. Selis D, Pande Y, Smoczer C, Wheeler M, Alhabeil J, Paurazas S, et al. Cytotoxicity

- and Genotoxicity of a New Intracanal Medicament, 2-hydroxyisocaproic Acid—An In Vitro Study. *J Endod* [Internet]. 2019;45(5):578–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.01.012>
32. Nogueira D, Mitjans M, Rolim C, Vinardell M. Mechanisms Underlying Cytotoxicity Induced by Engineered Nanomaterials: A Review of In Vitro Studies. *Nanomaterials*. 2014;4(2):454–84.
 33. Kim D, Kim E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. in vitro studies. *Restor Dent Endod*. 2014;40(2):97.
 34. Beltes PG, Pissiotis E, Koulaouzidou E, Kortsaris AH. In vitro release of hydroxyl ions from six types of calcium hydroxide nonsetting pastes. *J Endod*. 1997;23(7):413–5.
 35. Dammaschke T. The history of direct pulp capping. *J Hist Dent*. 2008;56(1):9–23.
 36. Farhad A, Mohammadi Esfahan Z. Calcium hydroxide: a review Chemical characteristics of calcium hydroxide. *Int Dent J*. 2005;55:293–301.
 37. 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;45(4):311–6.
 38. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci*. 2003;11(4):269–82.
 39. Stamos DG, Haasch GC, Gerstein H. The pH of Local Anesthetic / Calcium Hydroxide Solutions El pH de las Mezclas de Anestésicos Locales con Hidróxido de Calcio. 1985;11(6):9–10.
 40. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* [Internet]. 1985;(16).

Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119520233/abstract>

41. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: A critical review. *Int Endod J.* 1999;32(5):361–9.
42. Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: Classification and clinical indications. *Int Endod J.* 1999;32(4):257–82.
43. Estrela C, Pesce H. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog--Part I. *Braz Dent J.* 1996;7(1):41–6.
44. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J.* 2001;34(5):341–5.
45. Soares I, Golberg F. *Endodoncia Técnicas y Fundamentos*. 2nd ed. Mexico: Medica Panamericana; 2012.
46. Siqueira JF, Magalhães KM, Rôças IN. Bacterial Reduction in Infected Root Canals Treated With 2.5% NaOCl as an Irrigant and Calcium Hydroxide/Camphorated Paramonochlorophenol Paste as an Intracanal Dressing. *J Endod.* 2007;33(6):667–72.
47. Rodríguez-Niklitschek C, Oporto V GH. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review. *Rev Odontológica Mex.* 2015;19(3):e177–82.
48. Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, de Mattos-Guaraldi AL, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J.* 2009;20(1):32–6.
49. Evans M, Davies J., Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002;35:221–8.
50. Aakriti, Bali D, Sharma P, Bhatt VD, Bhasin P, Arora E, et al. Antimicrobial Potential

- of Calcium Hydroxide Chlorhexidine, Octenidol, Endoseptone and Combination of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* as Intracanal Medicament. *J Pure Appl Microbiol.* 2019;13(3):1725–35.
51. Llamas R. In vitro effect of parachlorophenol and camphorated parachlorophenol on macrophages. *J Endod.* 1997;23(12):728–30.
 52. Zhang F qiu, Meng H xin, Han J, Liu K ning. [Effects of emdogain on human periodontal ligament cells in vitro]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2012;44(1):6–10.
 53. Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine - Pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(7):1321–6.
 54. Siqueira JF, de Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod.* 1997;23(3):167–9.
 55. Basrani B. Chlorhexidine Gluconate. *Aust Endod J.* 2005;3(32):1–5.
 56. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(5):618–24.
 57. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J.* 2007;52(2):118–21.
 58. Moon JH, Choi YS, Lee HW, Heo JS, Chang SW, Lee JY. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *J Microbiol.* 2016;54(4):322–9.
 59. De Rossi A, Silva LAB, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.*

- 2005;99(5):628–36.
60. Faria G, Celes MRN, De Rossi A, Silva LAB, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of Chlorhexidine Toxicity Injected in the Paw of Mice and Added to Cultured L929 Fibroblasts. *J Endod*. 2007;33(6):715–22.
 61. da Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P, da Silva LAB, Consolaro A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Braz Dent J*. 2009;20(2):99–106.
 62. Ulusoy AT, Kalyoncuoğlu E, Reis A, Cehreli ZC. Antibacterial effect of N-acetylcysteine and taurolidine on planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis*. *Dent Traumatol*. 2016;32(3):212–8.
 63. Nakamura Y, Shimetani A, Fujii H, Amano O, Sakagami H, Takahashi K. Glutathione Can Efficiently Prevent Direct Current-induced Cytotoxicity. *J Endod*. 2008;34(6):693–7.
 64. Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res* [Internet]. 2018;52(7):751–62. Available from: <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1468564>
 65. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2013;1830(8):4117–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.016>
 66. 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.
 67. Pei Y, Liu H, Yang Y, Yang Y, Jiao Y, Tay FR, et al. Biological activities and potential oral applications of N-acetylcysteine: Progress and prospects. *Oxid Med*

- Cell Longev. 2018;2018.
68. Millea PJ. N-acetylcysteine: Multiple clinical applications. *Am Fam Physician*. 2009;80(3):265–9.
 69. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of enterococcus faecalis. *J Endod [Internet]*. 2012;38(1):81–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.10.004>
 70. Rodríguez-Velázquez E, Silva M, Taboada P, Mano JF, Suárez-Quintanilla D, Alatorre-Meda M. Enhanced cell affinity of chitosan membranes mediated by superficial cross-linking: A straightforward method attainable by standard laboratory procedures. *Biomacromolecules*. 2014;15(1):291–301.
 71. Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio ALG, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Faria G, et al. Biocompatibility of Intracanal Medications Based on Calcium Hydroxide. *ISRN Dent*. 2012;2012(February 2014):1–6.
 72. Abbaszadegan A, Dadollahi S, Gholami A, Moein MR, Hamedani S, Ghasemi Y, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of cinnamomum zeylanicum, calcium hydroxide, and triple antibiotic paste as root canal dressing materials. *J Contemp Dent Pract*. 2016;17(2):105–13.
 73. Hernández-Ríos P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernández M. Oxidative stress in the local and systemic events of apical periodontitis. *Front Physiol*. 2017;8(NOV):1–8.
 74. Kim NR, Park HC, Kim I, Lim BS, Yang HC. In vitro cytocompatibility of n-acetylcysteine-supplemented dentin bonding agents. *J Endod [Internet]*. 2010;36(11):1844–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.005>
 75. Pinar Karapinar S, Ulu YZA, Ozcelik B, Dogan Buzoglu H, Ceyhan D, Balci Peynircioglu B, et al. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol*. 2016;68:48–54.

76. Corazza B, Martinho F, Khoury R, Toia C, Orozco E, Prado R, et al. Clinical influence of calcium hydroxide and N-acetylcysteine on the levels of resolvins E1 and D2 in apical periodontitis. *Int Endod J*. 2021;54(1):61–73.
77. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(8):4814–22.