

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA

PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROLONGADO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA
MEDICACIÓN INTRACONDUCTO DE HIDRÓXIDO DE CALCIO CON ADICIÓN DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y QUITOSANO**

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

PRESENTA

C.D. MARÍA GUADALUPE LÓPEZ MINERO

PRESIDENTE

DIRECTOR DEL PROYECTO

DR. MIGUEL ÁNGEL CADENA ALCÁNTAR

SINODAL

CO-DIRECTOR DEL PROYECTO

DR. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES

SINODAL

CO-DIRECTOR DEL PROYECTO

C.D.E.E. LUIS HERNÁN CARRILLO VÁRGUEZ

SINODAL

CO-DIRECTORA DEL PROYECTO

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA

JUNIO DEL 2019

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a Junio del 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DEL EFECTO PROLONGADO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MEDICACIÓN INTRACONDUCTO DE HIDRÓXIDO DE CALCIO CON ADICIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y QUITOSANO.**

Propuesto por la **CD María Guadalupe López Minero**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

A T E N T A M E N T E

**PRESIDENTE
DR. MIGUEL ÁNGEL CADENA ALCANTAR**

Ccp.- Archivo

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a Junio del 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DEL EFECTO PROLONGADO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MEDICACIÓN INTRACONDUCTO DE HIDRÓXIDO DE CALCIO CON ADICIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y QUITOSANO.**

Propuesto por la **CD María Guadalupe López Minero**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

A T E N T A M E N T E

DR. Horacio Eusebio Almanza Reyes

**SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO**

Ccp.- Archivo

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a Junio del 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DEL EFECTO PROLONGADO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MEDICACIÓN INTRACONDUCTO DE HIDRÓXIDO DE CALCIO CON ADICIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y QUITOSANO.**

Propuesto por la CD María Guadalupe López Minero, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

A T E N T A M E N T E

**C.D.E.E. Luis Hernán Carrillo Vázquez
SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO**

Ccp.- Archivo

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, B.C. a junio del 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **EVALUACIÓN DEL EFECTO PROLONGADO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MEDICACIÓN INTRACONDUCTO DE HIDRÓXIDO DE CALCIO CON ADICIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y QUITOSANO.**

Propuesto por la **CD María Guadalupe López Minero**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

A T E N T A M E N T E

Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez

**SINODAL
CO-DIRECTORA DEL PROYECTO**

Ccp.- Archivo

**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROLONGADO DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE LA MEDICACIÓN INTRACONDUCTO DE HIDRÓXIDO DE
CALCIO CON ADICIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y QUITOSANO**

PRESENTA

C.D. María Guadalupe López Minero

**PRESIDENTE
(DIRECTOR DEL PROYECTO)**

DR. MIGUEL ÁNGEL CADENA ALCÁNTAR

**SINODALES
(CO-DIRECTORES DEL PROYECTO)**

SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO

DR. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES

SINODAL
CO-DIRECTOR DEL PROYECTO

C.D.E.E. LUIS HERNÁN CARRILLO VÁRGUEZ

SINODAL
CO-DIRECTORA DEL PROYECTO

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

Tijuana, Baja California, Junio del 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo de tesis a mis amados madre, padre y familia. A mis padres por ser un gran ejemplo de vida y por el apoyo incondicional que me han brindado desde mi niñez, por enseñarme el camino a andar y ser una mejor persona cada día.

A mi amado esposo que me motivó en todo momento a seguir, que me enseñó que el cansancio es pasajero y la recompensa siempre vale la pena, gracias por estar para mí en todo momento.

Un especial agradecimiento a mi Director de tesis Dr. Miguel Ángel Cadena Alcantar por su esfuerzo, paciencia y dedicación en este trabajo.

A la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez, Co-directora de esta tesis, por su constante motivación y creer en mí.

Al Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes, Co-director de esta tesis, por su disponibilidad, empeño y dedicación en este trabajo terminal.

Al C.D.E.E Luis Hernán Carrillo Vázquez, Co-director de esta tesis, por su interés, apoyo, motivación y ejemplo.

También quiero agradecer a todos los docentes que participaron en mi formación académica de posgrado.

Quiero agradecer a mis compañeros de posgrado por todos los momentos gratos vividos en este camino.

Al CONACyT por la beca otorgada.

CONTENIDO

1. AGRADECIMIENTOS.....	i
2. CONTENIDO	ii
3. ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
4. ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
5. LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
6. RESUMEN.....	x
7. INTRODUCCIÓN.....	1
7.1.Endodoncia.....	1
7.2.Vías de infección del conducto radicular	1
7.3.Desinfección.....	3
7.4.Hipoclorito de sodio.....	5
7.5.Nanotecnología	6
7.6.Nanopartículas de Plata (AgNPs).....	6
7.6.1Aplicaciones actuales	8
7.6.2.Mecanismo de acción.....	10
7.7.Nanopartículas de Quitosano.....	11
7.7.1Mecanismo de acción.....	12
7.8.Hidróxido de calcio	14
7.9.Características del género <i>Enterococcus</i>	17
7.9.1.Identificación del <i>Enterococo Faecalis</i>	18
.....	19
7.9.2.Morfología y Estructura.....	21
7.9.3.Virulencia	21
7.9.4.Epidemiología en endodoncia	21
7.9.5.Pared celular	22
8. JUSTIFICACIÓN.....	23
9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
10. HIPÓTESIS	25
10.1.Hipótesis de trabajo	25

10.2.Hipótesis nula.....	25
10.3.Hipótesis alternativa	25
11.OBJETIVOS	26
11.1.Objetivo general	26
11.2.Objetivo específico	26
12.VARIABLES.....	27
12.1.Variable dependiente	27
12.2.Variable independiente	27
13.OPERACIÓN DE VARIABLES	27
14.MATERIALES Y MÉTODOS	29
14.1.TIPO DE ESTUDIO	29
14.2.UNIVERSO DE ESTUDIO.....	29
15.METODOLOGÍA.....	29
15.1.Materiales e instrumental	29
15.2.Preparación de los dientes	30
15.3.Infección del conducto radicular experimental.....	31
15.4.Evaluación de la actividad antibacteriana	31
16.RESULTADOS	33
17.DISCUSIÓN.....	41
18.CONCLUSIONES	47
19.RECOMENDACIONES	48
20.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Muestra las vías de entrada para el establecimiento de la infección endodóntica:	2
1) Túbulo dentinarios, 2) Exposición pulpar directa, 3) Enfermedad periodontal, 4) Anacorésis .Imagen tomada de internet https://es.slideshare.net/ssucbba/infecciones-dentales-444599	2
Figura 2: Muestra irrigación y hace énfasis en la utilización de la punta ultrasónica para mejorar la limpieza y desinfección.....	3
.....	5
Figura 3: Muestra presentación comercial del hipoclorito de sodio.	5
Imagen tomada de internet https://www.fontanerialama.com/piscina-y-riegos/12-hipoclorito-de-sodio-20l-cloro-liquido-para-piscina.html	5
Figura 4: Diferentes estructuras con su tamaño característico y rango de dimensiones que trabaja habitualmente la nanotecnología, entre los 0,1-100 nm. Imagen editada de http://enigmacuatico.com/2015/07/06/como-nos-controlan-nanotecnologia-parte-3/ /	6
.....	7
Figura 5: Acción antiviral de las nanopartículas de plata frente a ciertos tipos de virus envueltos, tales como el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, hepatitis B y herpes simple, entre otros. Imagen tomada de internet https://www.xataka.com.mx/investigacion/con-nanoparticulas-de-plata-investigadores-de-la-unam-logran-tratar-el-moquillo-en-los-perros	7
.....	9
Figura 6: Empleo de la nanotecnología a la medicina, Nanotecnología antimicrobiana.	9
Imagen tomada de internet http://cienciaes.com/quilociencia/2011/08/20/nanotecnologia-antibacteriana/ /	9
Figura 7: Interacción con los grupos sulfhidrido de proteínas y ADN, alteración de la unión de hidrógeno / cadena respiratoria.....	10
.....	11
Figura 8: Microfotografía de nanopartículas de quitosano.	11
Imagen tomada de internet https://bashny.net/t/es/312753	11
Figura 9: Un diagrama esquemático que ilustra el mecanismo antibacteriano de las nanopartículas con carga positiva (por ejemplo, Chitosan). Biopelícula bacteriana madura que consiste en abundantes EPS y bacterias incluidas. Cuando se introducen nanopartículas catiónicas para el tratamiento de biopelículas, puede interactuar con EPS y células bacterianas. La interacción electrostática inicial entre nanopartículas con carga positiva y superficie bacteriana con carga negativa. La destrucción bacteriana se produce por la peroxidación lipídica mediada por contacto a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El daño a la membrana y el aumento de la permeabilidad de la membrana	

inestable eventualmente conduce a la entrada de nanopartículas en el citoplasma y la liberación de los componentes citoplasmáticos.....	13
Figura 10: Presentación comercial del hidróxido de calcio. Imagen tomada de internet https://www.google.com/search?q=hidroxido+de+calcio&rlz=1C5CHFA_enMX756MX756&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwis2q6o0u7hAhVCs6wKHRsmDicQ_AUIDigB&biw=1120&bih=630	14
.....	20
Figura 11: Tinción de gram de un hemocultivo con <i>Enterococo Faecalis</i>	20
Imagen tomada de Microbiología Médica de Patrick R. Murray.....	20
Figura 12: Muestra la agrupación por pares o cadenas cortas del <i>Enterococo Faecalis</i>	21
Imagentomada de internet https://es.slideshare.net/pabloandresriquehme9/enterococcus-generalidades-virulencia-y-resistencia-antibiotica	21
Figura 13: Estandarización a 15 mm cada grupo.	33
Figura 14: Subgrupos esterilizados.....	33
Figura 15a, 15b: Fotografías de siembra de alícuotas del grupo control y grupos experimentales a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata.....	34
Figura 16: Fotografía de grupo control a las 24 horas de incubación a 37°C con 100% de humedad tras sembrado de una alícuota de 10 µl de cada espécimen.....	34
Figura 17a, 17b, 17c: Fotografía de grupos a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata pos inoculación con <i>E. Faecalis</i> a las 24 horas de incubación sin medicación.....	35
Figura 18: Espectrofotómetro calculando la concentración aproximada a 8×10^6 UFC/ mL.	35
Figura 19: Microtubos con grupos experimentales a 7 días de incubación.	36
Figura 20a, 20b, 20c: Fotografía de grupos a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata pos inoculación con <i>E. Faecalis</i> a los 7 días de incubación sin medicación.....	36
Figura 21: Resiembra de grupo control a los 14 días mostrando el grupo control estéril.....	37
Figura 22a , 22b : Colocación de medicaciones correspondientes a cada subgrupo a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + quitosano con la ayuda de léntulos.	37
Figura 23: Materiales para la toma de muestra pos incubación 14 y 21 días.	38
Figura 24a, 24b: Toma de muestra para sembrado de alicuotas en condiciones asépticas en campana de flujo laminar.....	39
Figura 25a, 25b, 25c: Muestra de ausencia de crecimiento bacteriano en grupos con las medicaciones correspondientes: a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + quitosano con un periodo de incubación con de 14 días.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 26a, 26b, 26c: Muestra de crecimiento bacteriano correspondiente a <10,000 UFC/mL en grupos: a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + quitosano con un periodo de incubación con de 21 días.....	40
Figura 27: Muestra esquema de la actividad antimicrobiana de las Ag NPs.	43
Figura 28a, 28b, 28c, 28d: Reconstrucción CLSM tridimensional de biofilm (a, b) de <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) y después del tratamiento con antibacteriano con CS-np (c,d). El número de células bacterianas vivas se redujo significativamente, y la estructura tridimensional se rompió (9).	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos y especies de <i>Enterococcus</i> spp. Hasta la actualidad se conocen las siguientes especies de <i>Enterococcus</i> que pertenecen a este género.	19
Tabla 2. Muestra la operacionalización de variables.	28
Tabla 3. Muestra resultados en ambos intervalos de tiempo pos tratamiento.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Ag-MBG: Vidrio bioactivo mesoporoso con nanopartículas de plata.

Ag: Plata.

AgNPs: Nanopartículas de plata.

ARN: Ácido Ribonucleico

BHI: Infusión cerebro corazón.

Ca(OH)₂: Hidróxido de calcio.

Ca⁺⁺: Calcio.

CaOH₂: Hidróxido de calcio.

CO₂: Dióxido De Carbono.

CO₃: Iones Carbonato

CS-Np: Nanopartículas de chitosan (Quitano).

DD: Grado de desacetilación.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético.

EPS: Sustancia Polimérica Extracelular.

H: Hidrógeno.

NaCl: Cloruro de sodio.

NaOCl: Hipoclorito De Sodio.

NP: Nanopartícula.

OH: Iones Hidroxilo.

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR: Reacción cadena polimerasa.

PH: Potencial de hidrógeno.

ppm: Partes por millón.

ROS: Especies Reactivas De Oxígeno.

UFC: Unidades Formadoras De Colonias.

RESUMEN

La endodoncia es el campo de la odontología que estudia la morfología de la cavidad pulpar, la fisiología y la patología de la pulpa dental, así como la prevención, diagnóstico y tratamiento de las alteraciones pulpares y sus repercusiones sobre los tejidos periapicales.

El objetivo principal del tratamiento de conductos es realizar una desinfección para bajar o eliminar la carga bacteriana que coloniza el sistema de conductos, esto se logra a través de la instrumentación químico mecánica y se pretende erradicar o prevenir la reinfección con un sellado hermético.

El *Enterococo Faecalis* es el microorganismo principal encontrado en infecciones persistentes, éste es capaz de resistir a cambios de pH así como periodos prolongados sin nutrientes.

El uso de medicaciones intraconducto entre citas aumenta el éxito del tratamiento, siendo el principal agente utilizado el hidróxido de calcio, el cual por su pH alto actúa dañando la membrana celular y provoca la muerte bacteriana. Ésta investigación evaluó la eficacia antibacteriana del mismo en distintos periodos y buscó prolongar su efecto antibacteriano añadiendo sustancias como nanopartículas de plata y quitosano.

Las nanopartículas de plata debido a su tamaño y mecanismo de acción tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y bactericidas las cuales se sugieren como buen irrigante en el tratamiento de conductos. Las nanopartículas de quitosano presenta propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas el cual por su versatilidad lo podemos manejar de diversas maneras como hidrogeles o suspensiones con el objetivo de mejorar la desinfección.

En el presente estudio se utilizó pasta de hidróxido de calcio $[Ca(OH)_2]$, (Ultradent Inc.) como control de reacción, comparado con las mezclas del $Ca(OH)_2$ con

la adición de solución de nanopartículas de plata y la composición $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con nanopartículas de quitosano.

Los órganos dentarios fueron debidamente instrumentados hasta un calibre 30 / .04, realizando una irrigación copiosa con 5 ml de hipoclorito de sodio y una irrigación final de 1ml con EDTA, fueron secados con puntas de papel estéril, se realizó la infección con un cultivo puro de *Enterococo Faecalis* (ATCC 29212) como microorganismo de prueba. Las colonias bacterianas aisladas durante 24 horas se suspendieron en 5 ml del caldo infusión de cerebro y corazón (BHI), posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se transfirieron 20 μL de la suspensión bacteriana que está a una concentración aproximada de 8×10^6 UFC/ mL a cada canal bajo una campana de flujo laminar para realizar evaluación a los 14 y 21 días pos inoculación; se logró con el sembrado de alícuotas tomando 10 μL de los conductos de cada grupo (Grupo 1 Control, Grupo 2 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Nanopartículas de Quitosano, Grupo 3 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Grupo 4 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Nanopartículas de plata fueron incubadas por un periodo de 24 horas para su posterior evaluación.

Se colocaron la combinación de medicaciones intraconducto utilizando pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con la adición de 1.2 mL de solución de nanopartículas de plata, así como la mezcla con nanopartículas de quitosano, para su posterior incubación por un periodo de 14 y 21 días.

La evaluación a los 14 días del crecimiento microbiano mostró claras diferencias con las muestras iniciales. La segunda evaluación mostró resultados similares entre grupos, con cambios significativos respecto a la muestra inicial, ya que mostraron escaso crecimiento bacteriano de $<10,000$ UFC/mL.

INTRODUCCIÓN

ENDODONCIA

Es el campo de la odontología que estudia la morfología de la cavidad pulpar, la fisiología y patología pulpar, así como la prevención y tratamiento de las alteraciones pulpares y de sus repercusiones sobre los tejidos periapicales.

Para llevar a cabo un tratamiento de conducto se llevan a cabo una serie de procedimientos como lo es la apertura, preparación biomecánica y dentro de ésta, una de las fases más importantes que es la desinfección, para finalizar con un sellado hermético y tridimensional que prometa resistir el ingreso de bacterias al sistema de conductos (1).

Vías de infección del conducto radicular

La caries es probablemente la vía más común para la entrada de bacterias a la pulpa; sin embargo, las bacterias poseen muchas posibilidades para invadir la pulpa y el conducto radicular.

En condiciones normales, la pulpa dental y la dentina son estériles, las cuales están aisladas de los microorganismos orales por el esmalte y el cemento que las recubren. Hay circunstancias en las que se pierde la integridad de estas capas protectoras: Caries, fracturas, grietas traumáticas, filtración de restauraciones, raspado y alisado radicular, desgaste o abrasión.

También los microorganismos pueden acceder a la pulpa por los agujeros laterales y apicales. Las principales puertas de entrada para la infección pulpar son:

1.- Túbulos dentinarios: siempre que la dentina queda al descubierto, la pulpa queda expuesta a infecciones, debido a la permeabilidad de la dentina, la cual el diámetro (media, 0,9 μm), siendo la densidad de los tubulillos dentinarios mayor cerca de la pulpa.

2.- Exposición pulpar directa: es la vía más fácil para las infecciones endodónticas; se puede dar por tratamientos de restauración iatrógenicos o traumatismos.

3.- Enfermedad periodontal: invasión de bacterias a través de los conductos laterales, accesorios, o por el forámen apical a partir de bolsas periodontales.

4.- Anacorésis: los microorganismos son transportados en la sangre o la linfa hasta una zona de daño tisular, en donde abandonan el vaso, pasan al tejido dañado y producen infección. (Fijación de microorganismos provenientes de bacteremias) (2).

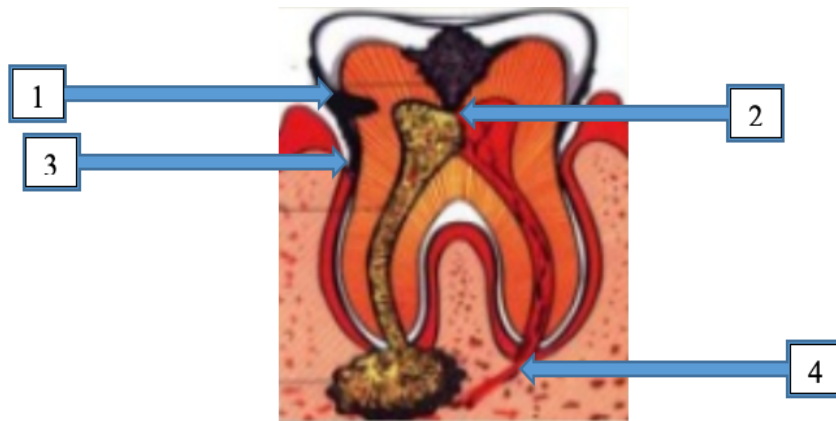


Figura 1: Muestra las vías de entrada para el establecimiento de la infección endodóntica:

1) Túbulos dentinarios, 2) Exposición pulpar directa, 3) Enfermedad periodontal, 4) Anacorésis
.Imagen tomada de internet <https://es.slideshare.net/ssucbba/infecciones-dentales-444599>.

Los objetivos finales de tratamiento endodóntico son la erradicación de la etiología microbiana; la curación completa de patología periapical; y restauración para proporcionar un sello coronal, la función de restauración, y prevenir la reinfección. La inflamación pulpar predominantemente se ha asociado con la participación de microbios y / o trauma dental. Sin embargo, es un proceso reaccionario multifactorial (3). El éxito de la terapia de endodoncia depende de la preparación adecuada, la desinfección y la obturación del conducto radicular, proporcionando las condiciones óptimas para la reparación del tejido periapical. Numerosas técnicas y dispositivos de riego han sido probados para mejorar la limpieza y desinfección del sistema de

conductos radiculares (4, 5). El fracaso en los tratamientos endodónticos, así como infecciones recurrentes y otras afecciones en dichos tratamientos, requieren de un nuevo tratamiento ya que encontramos diferentes tipos de microorganismos. El *Enterococcus Faecalis* y *Cándida Albicans* han sido identificadas en la mayoría de los retratamientos en caso de los fracasos endodónticos (4).

Desinfección

La pulpa puede infectarse con varios tipos de microorganismos bacterias, levaduras, virus y producir una periodontitis apical. Para llevar a cabo una adecuada desinfección existen diversas soluciones irrigantes, las cuales han sido estudiadas a lo largo de los años para demostrar sus propiedades, con el fin de buscar el irrigante que cumpla con los siguientes objetivos:

En resumen, la irrigación busca:

1. Limpieza.
2. Desinfección.
3. Lubricación (1).



Figura 2: Muestra irrigación y hace énfasis en la utilización de la punta ultrasónica para mejorar la limpieza y desinfección.

Para esto el irrigante ideal debe cumplir con ciertas características como los son:

- Ser germicida y fungicida.
- No irritar a los tejidos periapicales.
- Mantenerse estable en solución.
- Tener efecto antimicrobiano prolongado.
- Ser activo en presencia de sangre, suero y derivados proteicos del tejido.
- Tener una tensión superficial baja.
- No interferir con la reparación de los tejidos periapicales.
- No teñir la estructura dental.
- Poder inactivarse en un medio de cultivo.
- No inducir una respuesta inmune celular.
- Poder eliminar completamente el barrillo dentinario y poder desinfectar la dentina subyacente y sus túbulos.
- No ser antigénico, tóxico ni cancerígeno para las células tisulares que rodean al diente.
- No tener efectos adversos en las propiedades físicas de la dentina expuesta.
- No tener efectos adversos en la capacidad de sellado de los materiales obturadores.
- Ser de aplicación práctica.
- Ser relativamente económico.

La desinfección química es importante para el éxito del tratamiento, puesto que alcanza las bacterias y los hongos presentes en los túbulos dentinarios y en las ramificaciones del sistema de conductos radiculares. Por desgracia, las soluciones tóxicas para las células bacterianas también suelen serlo para las células humanas; por tanto, se debe tener cuidado para evitar la extrusión de los irrigantes a los espacios periapicales.

Hipoclorito de sodio

Es la solución irrigante más utilizada en endodoncia. Es un excelente antibacteriano, capaz de disolver tejido necrótico, vital y componentes orgánicos de la dentina y biopelículas (6). El hipoclorito de sodio reacciona con ácidos grasos y aminoácidos en la pulpa dental, lo que produce una licuefacción del tejido orgánico (7). La eficacia antimicrobiana del hipoclorito de sodio, está basada en su alto pH (acción de iones hidroxilo). El alto pH del hipoclorito de sodio interfiere en la integridad de la membrana citoplásmica con una inhibición enzimática irreversible, alteraciones biosintéticas en el metabolismo celular y la degradación de los fosfolípidos.



Figura 3: Muestra presentación comercial del hipoclorito de sodio.

Imagen tomada de internet <https://www.fontanerialama.com/piscina-y-riegos/12-hipoclorito-de-sodio-20l-cloro-liquido-para-piscina.html>.

Nanotecnología

Definimos la nanotecnología como “el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas controlando el tamaño y la forma a escala manométrica” (8).

Recientemente, la nanotecnología ha sido un área cada vez más amplia de investigación y oportunidades. Debido a las novedosas propiedades físicas y químicas de los materiales en la nanoescala, los nanomateriales se han utilizado para crear nuevos productos de consumo, así como aplicaciones para las ciencias de la vida y la biotecnología. Químicamente, las nanopartículas (NP) son muy diversas (9).

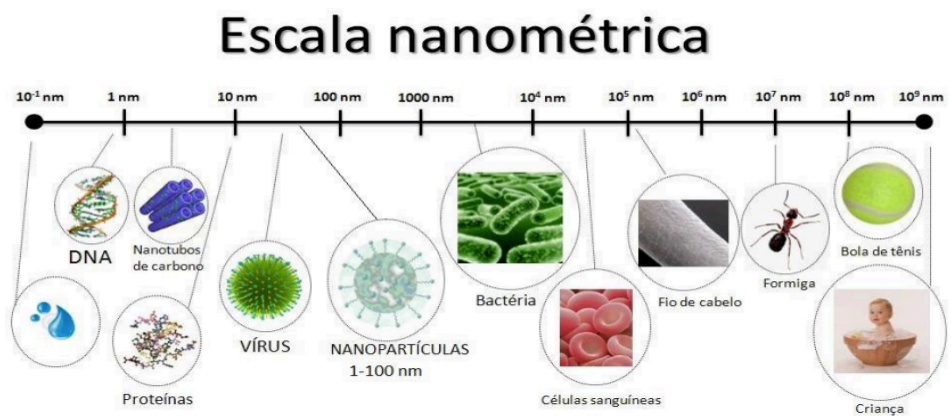


Figura 4: Diferentes estructuras con su tamaño característico y rango de dimensiones que trabaja habitualmente la nanotecnología, entre los 0,1-100 nm. Imagen editada de <http://enigmacuantico.com/2015/07/06/como-nos-controlan-nanotecnologia-parte-3/>

Nanopartículas de Plata (AgNPs)

Una nanopartícula es un tipo de nanoestructura donde los clúster de átomos que lo forman tienen que tener un tamaño de 1-100 nm. Las nanopartículas de plata muestran interesantes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas y catalíticas que, en general, se relacionan con su tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura de la partícula, pudiendo ser interesantes desde el punto de vista de su aplicación práctica. Las AgNPs destacan por su potencial y versatilidad, ya

que son aplicables en optoelectrónica, catálisis, procesos de remediación ambiental. Como herramienta en aplicaciones biomédicas, debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas y estructurales; su fotoactividad las promueve como agente antimicrobiano (bactericida-fungicida) y han resultado ideales para marcaje celular.

Sin embargo, la plata en los diversos métodos de aplicación debe utilizarse con precaución, porque su toxicidad es dependiente de la concentración. La evidencia indica efectos adversos de los NP de Ag en la salud humana y en el medio ambiente. Su pequeño tamaño, gran área de superficie por unidad de masa, composición química y efectos en las propiedades de la superficie pueden ser factores importantes en la toxicidad inducida por NP, y el daño oxidativo no específico es una de las mayores preocupaciones (9).

En el caso de la aplicación dental, la plata y sus nanopartículas han sido probadas para su aplicación como material de restauración dental, material de relleno retrógrado endodóntico, implantes dentales y solución inhibitoria de caries.

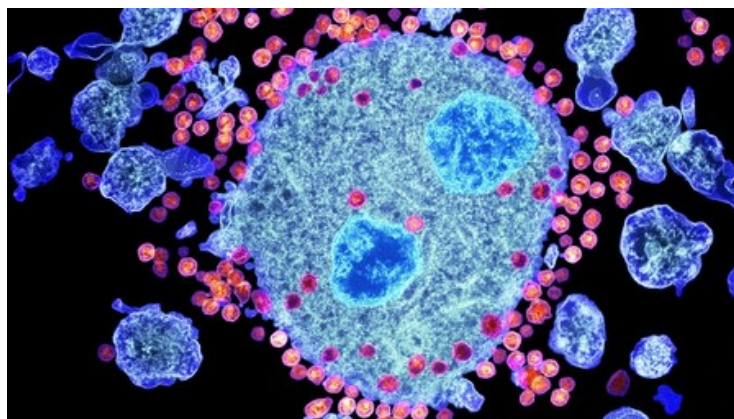


Figura 5: Acción antiviral de las nanopartículas de plata frente a ciertos tipos de virus envueltos, tales como el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, hepatitis B y herpes simple, entre otros. Imagen tomada de internet <https://www.xataka.com.mx/investigacion/con-nanoparticulas-de-plata-investigadores-de-la-unam-logran-tratar-el-moquillo-en-los-perros>.

Aplicaciones actuales

Hiraishi et al. (10) probaron el fluoruro de diamina de plata frente a las biopelículas de *Enterococo Faecalis in vitro* y mostraron la eliminación completa de las biopelículas de 48 horas después de 60 minutos de interacción; 3,8% de fluoruro de diamina de plata también se encontró depositado en la superficie de la dentina y penetró a 40 nm en los túbulos dentinarios. Otro estudio mostró que la eficacia de la antibio-película de Ag-NP era significativa cuando se aplicaba como un medicamento y no como un irrigante; Se descubrió que 0.02% de gel Ag-NP como medicamento durante 7 días era significativamente mejor en la rotura de biopelícula de *Enterococo faecalis* en comparación con los grupos de hidróxido de calcio y la irrigación con jeringa con una concentración más alta de solución de Ag-NP (0.1%). Sugirieron que, cuando se usa como medicamento, hay una interacción prolongada entre las Ag-NP cargadas positivamente y la bacteria / biofilm cargada negativamente, lo que da como resultado esta diferencia. La suspensión de Ag-NP cuando se combinó con hidróxido de calcio mostró *Enterococo faecalis* significativamente reducida a partir de la dentina del conducto radicular. Otro estudio reciente mostró una variación de la eficacia antibacteriana de las NP-Ag con carga y en presencia de dentina como inhibidor tisular.

Las Ag-NP de 9 nm de tamaño y la carga positiva tenían la menor concentración inhibitoria mínima contra *Enterococo faecalis* planctónica en comparación con hipoclorito de sodio, clorhexidina y las otras Ag-NPs analizadas. Los Ag-NP con carga positiva impidieron por completo el crecimiento de *Enterococo faecalis* planctónico en tan solo 5 minutos de tiempo de contacto y conservaron la eficacia antibacteriana incluso en presencia de dentina. Además, se descubrió que estas Ag-NP eran citocompatibles con las células de fibroblastos. Se ensayó vidrio bioactivo mesoporoso cargado con Ag-NP (Ag-MBG) contra biopelículas de *Enterococo Faecalis* de 4 semanas en los conductos radiculares. Se observó una disrupción significativa de la estructura de la biopelícula en comparación con el vidrio bioactivo mesoporoso y el hidróxido de calcio, que se ha contribuido principalmente a los iones Ag conservados liberados de la estructura mesoporosa. Todos estos resultados positivos con estudios

in vitro justifican más experimentos en modelos *in vitro* clínicamente relevantes / situaciones *in vivo* para confirmar las ventajas de usar Ag-NP para la desinfección del conducto radicular.

Dos problemas principales asociados con Ag-NP son la posible decoloración de la dentina y la toxicidad hacia las células de mamíferos. Gomes-Filho et al (11) probaron 2 concentraciones diferentes de Ag-NP (90 nm) en modelos de rata Wistar. La reacción tisular *in vivo* de una respuesta inflamatoria crónica leve a moderada se observó y dependía de la concentración. Después de 15 días, 47 ppm de Ag-NP mostraron una reacción que era comparable con el 2,5% de hipoclorito de sodio. Las concentraciones tóxicas de iones de plata son de aproximadamente 1-10 mg/L, y las Ag-NP son de 10-100 mg/L para células eucarióticas (11). La investigación se ha dirigido hacia la modificación y el desarrollo de Ag-NP con actividad antibacteriana específica y una menor citotoxicidad para las células huésped. Aparte del tamaño y la estructura de las Ag-NP, se ha demostrado que la presencia de proteínas en un medio biológico tiene una gran influencia en la interacción y la toxicidad de estas nanopartículas hacia las células(12).

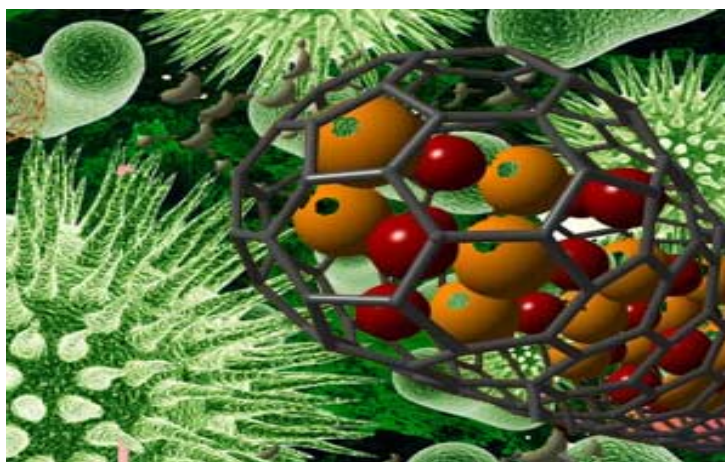


Figura 6: Empleo de la nanotecnología a la medicina, Nanotecnología antimicrobiana.

Imagen tomad de internet <http://cienciaes.com/quilociencia/2011/08/20/nanotecnologia-antibacteriana/>

Mecanismo de acción

Se sabe que la plata produce un efecto antibacteriano al actuar sobre múltiples objetivos a partir de la interacción con los grupos sulfhidrilo de proteínas y ADN, alterar la unión de hidrógeno / cadena respiratoria, desenrollar el ADN e interferir con la síntesis de la pared celular / división celular. Se sabe que las nanopartículas de plata (Ag-NP) desestabilizan aún más la membrana bacteriana y aumentan la permeabilidad, lo que provoca una fuga de constituyentes celulares (9).

La efectividad antimicrobiana de algunas nanopartículas se basa en la alta relación superficie-volumen y la reactividad en la pequeña escala de las nanopartículas frente a los agentes patógenos. El mecanismo de acción del efecto bactericida se basa en el cambio de la permeabilidad de la membrana celular del patógeno y la alteración de la funciones respiratorias y la inhibición de ciertas enzimas asociadas en el proceso de respiración, siendo el detonante para el inicio de formación que dañan la célula (13).

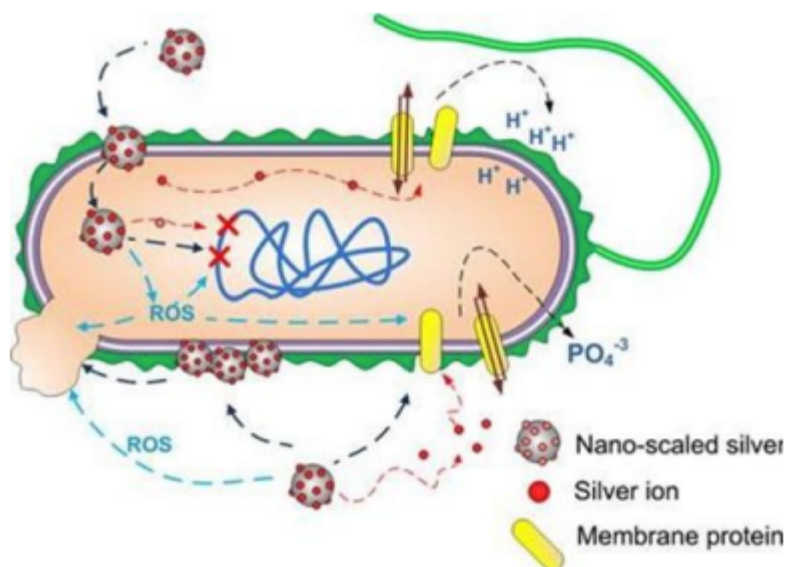


Figura 7: Interacción con los grupos sulfhidrilo de proteínas y ADN, alteración de la unión de hidrógeno / cadena respiratoria.

Nanopartículas de Quitosano

El quitosano (poli [1,4-b-D-glucopiranosamina]), un derivado desacetilado de la quitina, es el segundo biopolímero natural más abundante. Las nanopartículas de quitosano (CS-NP) podrían sintetizarse o ensamblarse utilizando diferentes métodos dependiendo de la aplicación final o las características físicas requeridas en las nanopartículas. El quitosano ha recibido gran interés en la biomedicina debido a su versatilidad en diversas formas, como el polvo (micro y nanopartículas), cápsulas, películas, andamios, hidrogeles, perlas y vendajes. El quitosano tiene una estructura similar a la matriz extracelular y por lo tanto se utiliza para reforzar las construcciones de colágeno. Este polímero hidrófilo con una gran cantidad de grupos hidroxilo y amino libre puede someterse a numerosas modificaciones químicas e injertos, lo que da como resultado la funcionalización, que se analiza en una sección separada. Las nanopartículas de quitosano se han desarrollado principalmente para aplicaciones antibacterianas y de administración de fármacos / genes.

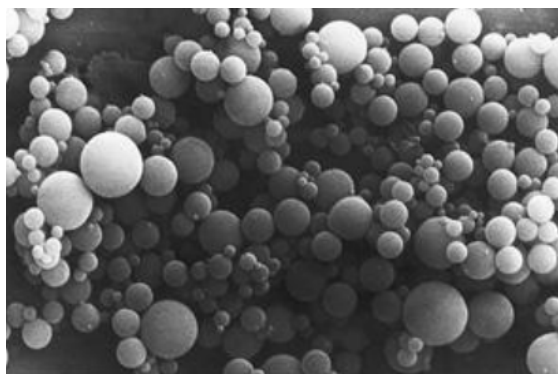


Figura 8: Microfotografía de nanopartículas de quitosano.

Imagen tomada de internet <https://bashny.net/t/es/312753>

El quitosano tiene excelentes propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas. En el caso de las bacterias, las bacterias gram positivas fueron más susceptibles que las gram negativas. Las concentraciones inhibitorias mínimas

oscilaron entre 18 y 5000 ppm dependiendo del organismo, el pH, el grado de desacetilación (DD), el peso molecular, las modificaciones químicas y la presencia de lípidos y proteínas. Se sabe que DD influye en la actividad antibacteriana. Con un mayor DD, el número de grupos amino aumenta por unidad de glucosamina y, por lo tanto, el quitosano mostró una mayor eficacia antibacteriana. Se espera que las nanopartículas de quitosano (CS-NP) en virtud de su carga y tamaño posean una actividad antibacteriana mejorada.

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción propuesto es la muerte mediada por contacto que implica la atracción electrostática de quitosano cargado positivamente con membranas celulares bacterianas cargadas negativamente. Esto podría conducir a la permeabilidad alterada de la pared celular, lo que eventualmente resultaría en la ruptura de las células y la fuga de los componentes proteicos y otros componentes intracelulares. Bajo microscopía electrónica de transmisión, se observó que las células bacterianas estaban completamente envueltas en el quitosano, formando una capa impermeable. Esto podría resultar en la prevención del transporte de solutos esenciales que conducen a la muerte celular. En el caso de los hongos, se hipotetizó que el quitosano ingresa a la célula y alcanza el núcleo, se une con el ADN e inhibe la síntesis de ARN y proteína (12).

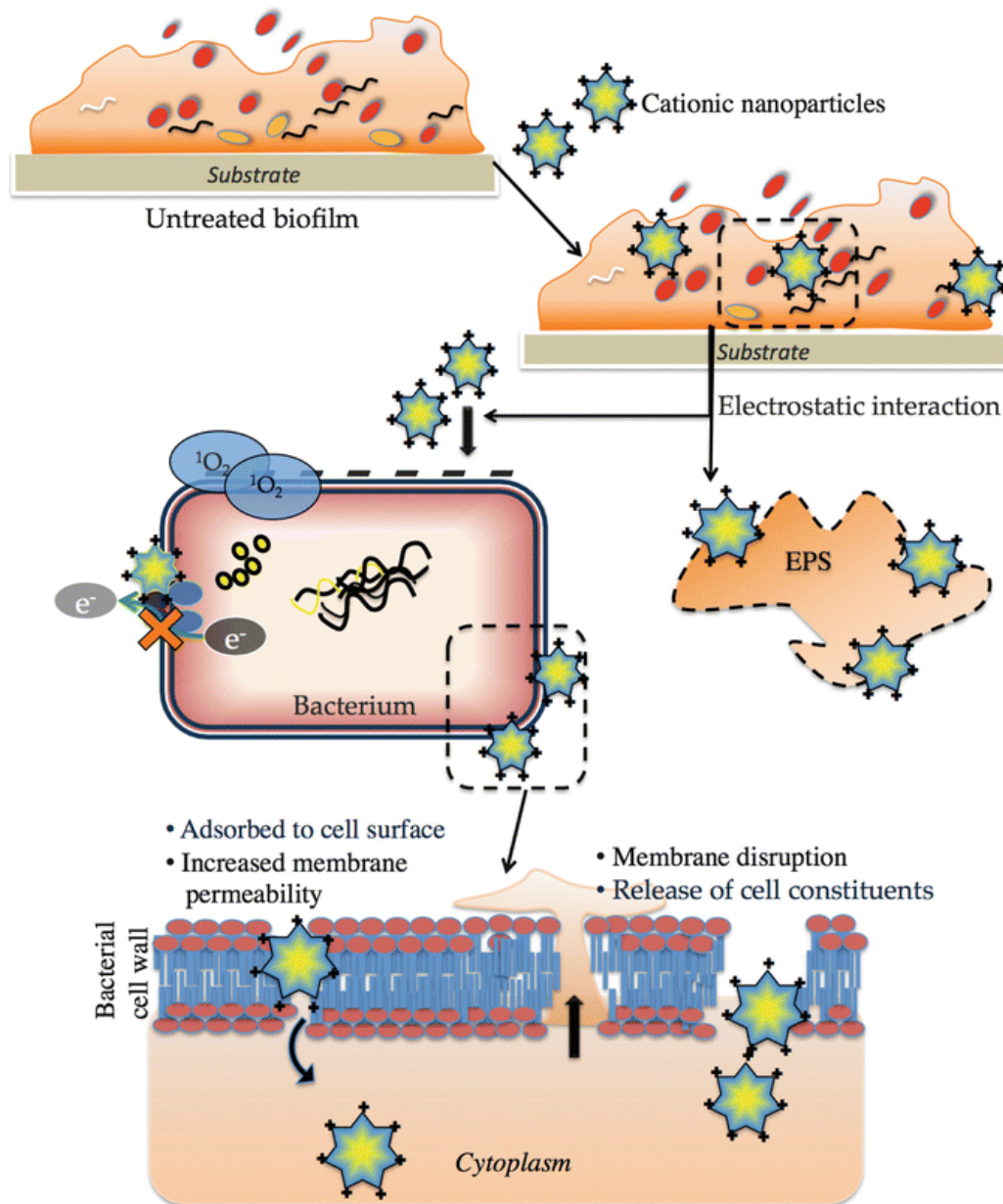


Figura 9: Un diagrama esquemático que ilustra el mecanismo antibacteriano de las nanopartículas con carga positiva (por ejemplo, Quitosano). Biopelícula bacteriana madura que consiste en abundantes EPS y bacterias incluidas. Cuando se introducen nanopartículas catiónicas para el tratamiento de biopelículas, puede interactuar con EPS y células bacterianas. La interacción electrostática inicial entre nanopartículas con carga positiva y superficie bacteriana con carga negativa. La destrucción bacteriana se produce por la peroxidación lipídica mediada por contacto a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El daño a la membrana y el aumento de la permeabilidad de la membrana inestable eventualmente conduce a la entrada de nanopartículas en el citoplasma y la liberación de los componentes citoplasmáticos.

Hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio se introdujo originalmente en el campo de la endodoncia por Herman en 1920 como un agente que tapa la pulpa. Es un polvo blanco inodoro con la fórmula Ca(OH)_2 y tiene un peso molecular de 74.08. Ca(OH)_2 tiene baja solubilidad en agua (aproximadamente 1.2 g/L-1 a 25 °C), que disminuye a medida que aumenta la temperatura. El coeficiente de disociación de Ca(OH)_2 (0.17) permite una lenta, liberación controlada de iones de calcio e hidroxilo. La baja solubilidad es una buena característica clínica porque es necesario un largo período para que el Ca(OH)_2 se vuelva soluble en los fluidos tisulares cuando está en contacto directo con tejidos vitales. El Ca(OH)_2 tiene un pH alto (alrededor de 12.5- 12.8), es insoluble en alcohol y se clasifica químicamente como una base fuerte. Sus principales acciones son el resultado de la disociación iónica de los iones Ca^{2+} y OH^- y su efecto sobre los tejidos vitales, como inducir la deposición de tejido duro y ser antibacteriano. El Ca(OH)_2 se disocia en calcio e iones hidroxilo al contacto con fluidos acuosos.



Figura 10: Presentación comercial del hidróxido de calcio. Imagen tomada de internet

https://www.google.com/search?q=hidroxido+de+calcio&rlz=1C5CHFA_enMX756MX756&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwis2q6o0u7hAhVCs6wKHRsmDicQ_AUIDigB&biw=1120&bih=630

El Ca(OH)_2 en agua tiene un comportamiento tixotrópico, lo que significa que será muy fluido cuando se agite. Cuando el Ca(OH)_2 está expuesto a dióxido de carbono (CO_2) o iones de carbonato (CO_3^{2-}). Los iones hidroxilo del Ca(OH)_2 ejercen

su mecanismo de acción en la membrana citoplásmica porque allí es donde se localizan los sitios enzimáticos. Las enzimas extracelulares actúan sobre los nutrientes, carbohidratos, proteínas y lípidos que, a través de la hidrólisis, favorece la digestión. Las enzimas intracelulares localizadas en la célula favorecen la actividad respiratoria de la estructura de la pared celular. El gradiente de pH de la membrana citoplásmica se ve alterado por la alta concentración de iones hidroxilo del hidróxido de calcio que actúa sobre las proteínas de la membrana (desnaturalización de proteínas). El alto pH del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ altera la integridad de la membrana citoplásmica por medio de daño químico a los componentes orgánicos y transporte de nutrientes o mediante la destrucción de fosfolípidos o ácidos grasos insaturados de la membrana citoplásmica durante la peroxidación proceso, que es una reacción de saponificación.

El ajuste del pH intracelular está influenciado por diferentes procesos celulares, como el metabolismo celular, alteraciones de la forma, movilidad, ajuste de los transportadores y polimerización de los componentes del citoesqueleto, activación de la proliferación y crecimiento celular, conductividad y transporte a través de la membrana, y volumen celular isosmótico. Por lo tanto, muchas funciones celulares pueden verse afectadas por el pH, incluidas las enzimas que son esenciales para el metabolismo celular. Estrela et al. descubrieron que la inactivación enzimática bacteriana en condiciones de pH extremas durante un largo período de tiempo es irreversible (14).

Como se requiere de un tiempo ideal de acción, para la efectiva destrucción de las bacterias por contacto directo en la luz del conducto radicular y por contacto indirecto en los túbulos dentinarios, más importante que el efecto antimicrobiano del vehículo empleado, será su capacidad de solubilidad a fin que actúe de manera sinérgica, lo ayude a difundir y a disociarse rápidamente, permitiéndole llegar a aquellos conductillos laterales, que son inaccesibles a la preparación mecánica, mejorando en consecuencia la propiedad antimicrobiana que el Hidróxido de Calcio tiene per sé (15). El vehículo utilizado para mezclar el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al parecer juega un papel importante, puesto que determina el tiempo que los iones Ca^{++} y OH^- se

mantendrán libres luego de haberse disociado. Se han propuesto tres tipos de vehículos: acuosos, viscosos y aceitosos (16).

Los vehículos acuosos están constituidos por sustancias soluble en agua, como agua, solución salina y anestésicos. En este caso, luego de la disociación iónica, los iones OH^- se inactivan rápidamente al unirse a átomos de hidrógeno (H) del vehículo utilizado, que a pesar de estar saturados mantienen una ligera carga positiva, pudiendo formar enlaces dipolo-dipolo con los iones OH^- que mantienen carga negativa. De igual los iones OH^- reaccionan con los sistemas buffer de la dentina, reduciendo el tiempo de efectividad del hidróxido de calcio (17,18). Algunos de los vehículos viscosos también son solubles en agua, pero su alto peso molecular permite que luego de la disociación iónica, la inactivación de los iones Ca^{++} y OH^- ocurra más lentamente, al reducirles su capacidad de difusión. Dentro de este grupo se encuentran la glicerina, el propilenglicol y el polietilenglicol. Estas sustancias se caracterizan por tener en sus estructuras químicas grupos OH con ligera carga negativa, los cuales pueden reaccionar con el ión Ca^{++} a través de enlaces ión-dipolo, así como átomos de hidrógeno que pueden reaccionar con los iones OH^- del hidróxido de calcio (18,19, 22-23).

Los vehículos aceitosos son sustancias no solubles en agua que tienen muy baja solubilidad y capacidad de difusión en los tejidos, en las que la disociación iónica no ocurre, por lo que el efecto del hidróxido de calcio será nulo. Por ello, utilizar un aceite como vehículo es un error. Químicamente es imposible medir el pH de un aceite, puesto que no permiten la disociación de iones H^+ y OH^- , confirmando la incompatibilidad del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con los aceites (16,23-25). Se ha reportado que la solución anestésica es el vehículo más favorable para reducir la tensión superficial del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (20). Al contrario, cuando el efecto que se busca es prolongar el tiempo de liberación iónica, se ha demostrado que el mejor vehículo es el propilenglicol (21).

Se ha comparado la eficacia en la colocación del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mezclado con agua o con glicerina, en dientes con conductos curvos. Los resultados mostraron que ninguna de las mezclas realizadas con agua logró alcanzar el tercio apical, en tanto

que sólo el 50% de las mezclas realizadas con glicerina lograron llegar al tercio apical, demostrando así las dificultades que conlleva su aplicación correcta dentro del conducto radicular (18).

Características del género *Enterococcus*

El término “enterococo” fue por primera vez acuñado por Thiercelin en una publicación del año 1899 en Francia, para referirse a unos nuevos diplococos Gram-positivos de origen intestinal. Tiempo después en el mismo año se describió el primer caso de endocarditis descrita por MacCallum y Hastings, la causa se le atribuyó a un microorganismo que denominaron *Micrococcus zymogenes*, trabajos posteriores darían a conocer que se trataba de un enterococo hemolítico (22). Más adelante en 1906 este microorganismo fue clasificado en el género *Streptococcus* por Andrewes y Holder, fue llamado *Streptococcus faecalis* al descubrirse en un paciente con endocarditis y por la semejanza que tenían con los microorganismos que habitan el intestino. El segundo microorganismo fecal fue descrito por Orla-Jensen en 1919, fue llamado *Streptococcus faecium* el cual compartía características similares con los demás miembros del género (23).

La clasificación e identificación de los estreptococos (enterococos) se basó por mucho tiempo en los grupos serológicos de Lancefield, hasta aquí todos los microorganismos eran designados según el orden del alfabeto, y se sabía para entonces que todos los *streptococos* (enterococos) poseían el antígeno del Grupo D y *Streptococcus Bovis* y *S. Equinus* también compartían este serotipo, pero más tarde serían reconocidos por Sherman (1937) como un grupo distinto al de los *Streptococcus*; los dividió en cuatro grupos: el grupo Enterococci, los ácido lácticos, el grupo viridans, y el grupo de los *Streptococcus pyogenes*; no obstante Kalina en 1970 propuso la creación del nuevo género *Enterococcus* donde se ubicarían especies como *Streptococcus Faecalius* y *Streptococcus Faecium*, también propuso que se pasara a este nuevo género especies como *Streptococcus durans*, a la clasificación de subespecies como *Enterococcus Faecium* subsp. *Durans* (24). Pero no fue hasta 1984, por los experimentos de hibridización ADN-ADN y ADN-ARNr realizados por

Schleifer y Kilpper-Balz, se oficializó el nuevo género *Enterococcus* al confirmar las diferencias moleculares y químicas que indicaban que las especies *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* tenían que ser nominales en el género *Enterococcus* ya que eran muy diferentes de los otros *Streptococcus* (22,25).

Identificación del Enterococo Faecalis

Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos, de morfología esférica u ovoide de 0.6 a 2.0 x 0.6 a 2.5 μm ; anaerobios facultativos, no tienen motilidad, con excepción de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Tienen gran capacidad de adaptabilidad a condiciones extremas como NaCl 6.5%, pH 9.6, son catalasa negativa, crecen a temperaturas de 10 a 45°C, pero su temperatura óptima es de 37°C, pueden sobrevivir mínimo por 30 min a 60°C, se desarrollan en presencia de 40% de bilis e hidrolizan la esculina; así como otros *Streptococcus* del grupo D, a diferencia de éstos dan negativo a la prueba PYR (L-pirrolindonil β -naltil-amida)(22). Por lo general producen, α o γ hemólisis, excepto algunas especies como *E. faecalis*, *E. durans* y *E. gallinarum* que pueden mostrar β -hemólisis (25).

Tabla 1. Grupos y especies de *Enterococcus* spp. Hasta la actualidad se conocen las siguientes especies de *Enterococcus* que pertenecen a este género.

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
Especie	Especie	Especie	Especie	Especie
<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. asini</i>	<i>E. columbae</i>
<i>E. gilvus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. ceccorum</i>	<i>E. canis</i>
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. sulfurous</i>	<i>E. moraviensis</i>
<i>E. pallens</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. ratti</i>	<i>E. phoeniculicola</i>	
<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. villorum</i>		
<i>E. raffinosus</i>	<i>E. haemoperoxidus</i>			
<i>E. saccharolyticus</i>				
*<i>Enterococcus</i>, especie CDC PNS-E-3 Esta especie fue aislada del tejido encefálico de un paciente de 11 meses en Honolulu, Honduras 2001. *<i>E. especie</i> CDCPNS-E2 Es una nueva especie del CDC que ha sido propuesta, aislada de hemocultivos en un paciente en Los Angeles 1997.				

Fuente: KONEMAN E., Allen Stephen. Diagnostico microbiológico: texto y atlas en color. 2008. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. p. 668-670.

Enterococo Faecalis son microorganismos anaerobios facultativos, inmóvil, catalasa negativo o débilmente positiva, con capacidad para fermentar glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido láctico, pero sin gas. Además, presenta capacidad para formar biopelículas. Los *Enterococcus* se diferencian de los

Streptococcus en que pueden crecer en un rango de temperatura de 10°C a 45°C. Son más resistentes a los cambios ambientales adversos, pudiendo tolerar concentraciones de 6,5% de NaCl, desarrollarse a pH 9.6 y soportar temperaturas de 60°C hasta por media hora.

Estas bacterias presentan adhesinas de superficie que facilitan su unión a las células que tapizan los tejidos intestinales y vaginales del organismo anfitrión humano, y secretan enzimas extracelulares con actividad hemolítica (citolisinas) y proteolítica (p. ej., gelatinasa, serina proteasa). Los enterococos son patógenos importantes, sobre todo en pacientes hospitalarios. Estos son una de las causas más frecuentes de infecciones hospitalarias. La vía urinaria es la localización más frecuente de las infecciones enterocócicas y las infecciones se asocian con frecuencia con cateterización o instrumentación urinaria. Estas infecciones pueden ser asintomáticas y son asociadas a fuga de bacterias intestinales, los sitios más afectados, vía urinaria, peritoneo, tejido cardíaco. Las enfermedades incluyen infecciones urinarias, peritonitis, infecciones de las heridas y bacteremia con o sin endocarditis. Los enterococos crecen con facilidad en medios no selectivos como agar sangre y agar chocolate. Estos microorganismos se pueden identificar fácilmente con tinción de gram y pruebas bioquímicas sencillas (26).

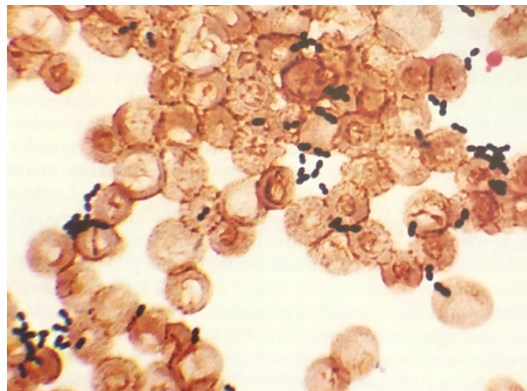


Figura 11: Tinción de Gram de un hemocultivo con *Enterococo Faecalis*.

Imagen tomada de Microbiología Médica de Patrick R. Murray.

Morfología y Estructura

Enterococcus faecalis son cocos de tamaño $0,6-2,0 \times 0,6-2,5 \mu\text{m}$, Gram positivos que se distribuyen en cadenas cortas o en pares. No forman esporas (27).

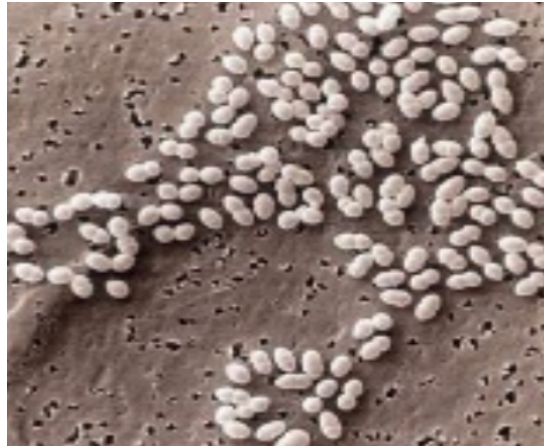


Figura 12: Muestra la agrupación por pares o cadenas cortas del *Enterococo Faecalis*. Imagen tomada de internet <https://es.slideshare.net/pabloandresriquelme9/enterococcus-generalidades-virulencia-y-resistencia-antibiotica>.

Virulencia

Su virulencia viene mediada por la capacidad de adherirse a las superficies del hospedador y la resistencia al tratamiento antibiótico.

Epidemiología en endodoncia

Siqueira y Roca., analizaron microorganismos asociados con enfermedades post-tratamiento utilizando PCR, se tomaron muestras de los conductos radiculares de veintidós dientes obturados con enfermedad persistente, que fueron seleccionados para retratamiento endodóntico. Se extrajo ADN de las muestras y se analizó la presencia de 19 especies diferentes mediante el uso de la PCR. Todas las muestras fueron

positivos para al menos una de las 19 especies estudiadas. *Enterococcus faecalis* fue la especie más prevalente y se detectó en el 77% de los dientes (28).

Pared celular

Enterococo Faecalis posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cual es un ácido lipoteicoico que se encuentra asociado con la membrana citoplasmática de la bacteria y que contiene residuos de glicerol. Además, posee gran cantidad de mureina y ácido teicoico. Por su parte, los ácidos lipoteicoico presente en la pared celular (antígeno grupo D) inducen la producción del factor de necrosis tumoral y del interferón gamma modulando la respuesta inmune (27).

JUSTIFICACIÓN

Gran parte de las patologías endodónticas están vinculadas a la presencia de bacterias. Existen distintas vías de entrada de microorganismos, siendo los túbulos dentinarios una ruta de entrada de bacterias y toxinas hacia el interior de los conductos radiculares. Cuando la pulpa se torna necrótica se vuelve un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos que posteriormente causan enfermedad en los tejidos periodontales a través del orificio apical y/o conductos accesorios.

Existen soluciones irrigantes para el tratamiento de los conductos radiculares, sin embargo, al no permanecer por un tiempo prolongado dentro de los conductos radiculares, no suelen ser altamente eficaces, es una necesidad en casos de necrosis dejar una medicación intraconducto para lograr una mayor erradicación de microorganismos.

Este trabajo terminal, nos permitirá evaluar un efecto prolongado de la medicación de hidróxido de calcio al adicionarle nanopartículas de plata y quitosano con una infección producido por *Enterococo Faecalis in vitro*, para estimar su estadio *in vivo*, y caracterizar los procedimientos clínicos y transmitirlos a la comunidad estudiantil del posgrado de endodoncia de la Universidad Autónoma de Baja California.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el presente proyecto se plantea la adición de nanopartículas de plata y quitosano al hidróxido de calcio para buscar aumentar su capacidad antimicrobiana y un efecto prolongado de la medicación intraconducto.

¿La adición de las nanopartículas de plata y/o quitosano ayudará a prolongar el efecto antimicrobiano del hidróxido de calcio?

HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

La investigación de este trabajo permitirá evaluar el incremento de la efectividad antimicrobiana, así como su efecto prolongado con la adición de nanopartículas de plata y quitosano al hidróxido de calcio que se utilizaran como medicación intraconducto contra *Enterococo Faecalis*.

Hipótesis nula

La adición de nanopartículas de plata no mostrará efectividad antimicrobiana prolongada contra *Enterococo Faecalis*.

La adición de nanopartículas de quitosano no mostrará efectividad antimicrobiana prolongada contra *Enterococo Faecalis*.

Hipótesis alternativa

La adición de nanopartículas de plata mostrará efectividad antimicrobiana prolongada contra *Enterococo Faecalis*.

La adición de nanopartículas de quitosano mostrará efectividad antimicrobiana prolongada contra *Enterococo Faecalis*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto prolongado de la pasta de hidróxido de calcio con la adición de nanopartículas de plata y nanopartículas de quitosano al ser utilizado como medicación intraconducto.

Objetivo específico

- 1) Evaluar el efecto antimicrobiano prolongado de la pasta de hidróxido de calcio frente al *Enterococcus Faecalis*.
- 2) Evaluar el incremento de la acción antibacteriana y un efecto prolongado de la pasta de hidróxido de calcio adicionada con nanopartículas de plata frente al *Enterococcus faecalis*.
- 3) Evaluar el incremento de la acción antibacteriana y un efecto prolongado de la pasta de hidróxido de calcio adicionada con nanopartículas de quitosano frente al *Enterococcus faecalis*.
- 4) Comparar la acción antibacteriana de las diferentes pastas frente al *Enterococcus Faecalis*.

VARIABLES

Variable dependiente

- Acción prolongada antibacteriana sobre el *Enterococcus Faecalis*.

Variable independiente

1. Pasta de hidróxido de calcio.

Cuenta con 3 niveles:

1. Pasta de hidróxido de calcio.
2. Composición de Pasta de hidróxido de calcio con nanopartículas de plata.
3. Composición de Pasta de Hidróxido de calcio con nanopartículas de quitosan.

OPERACIÓN DE VARIABLES

La prolongación de la medicación intraconducto, se refiere a la capacidad de liberación lenta del fármaco o en este caso de las nanopartículas de plata y nanopartículas quitosan, para evaluar su efecto en el transcurso del tiempo de espera entre citas. Los órganos dentarios serán estandarizados, instrumentados con el sistema Edge Sequel Sapphire (Albuquerque, New México USA) de acuerdo al fabricante, se sellarán las paredes externas radiculares y posteriormente serán esterilizados.

Se prepararán muestras en diferentes grupos y se contaminarán con *Enterococcus Faecalis* (ATCC 29212), posteriormente serán incubadas hasta un periodo de 14 días. Serán colocadas las pastas de hidróxido de calcio y a continuación se realizará la toma de muestras que serán seleccionadas al azar para realizar un

cultivo microbiológico y evaluar el crecimiento bacteriano a distintos intervalos de tiempo 14 y 21 días.

Tabla 2. Muestra la operacionalización de variables.

Variable	Conceptualización	Tipo de variable	Indicadores	Escala	Valor
<i>Enterococo faecalis</i>	El <i>Enterococo faecalis</i> es un cocos Gram positivos, de morfología esférica u ovoide de 0.6 a 2.0 x 0.6 a 2.5 µm; anaerobio facultativo, no tienen motilidad, presenta gran capacidad de adaptabilidad a condiciones extremas como NaCl 6.5%, pH 9.6, son catalasa negativa, crecen a temperaturas de 10 a 45°C, pero su temperatura óptima es de 37°C.	Variable dependiente	Cocos o esferas en cadenas cortas, bacteria gram-positiva.	Nominal	Positivo Negativo
Nanopartículas de plata	Las nanopartículas de plata presentan un tamaño entre 1-100 nm, muestran interesantes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas y catalíticas que, en general, se relacionan con su tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura de la partícula.	Variable Independiente	Se sabe que las nanopartículas de plata interaccionan con los grupos sulfhidrilo de proteínas y ADN, alterar la unión de hidrógeno, cadena respiratoria, desenrollar el ADN e interferir con la síntesis de la pared celular.	Nominal Concentración 3%	Positivo Negativo
Nanopartículas de quitosano	Las nanopartículas de quitosano ha recibido gran interés en la biomedicina debido a su versatilidad en diversas formas, como el polvo (micro y nanopartículas), cápsulas, películas, andamios, hidrogeles, perlas y vendajes.	Variable Independiente	Las nanopartículas de quitosano se han desarrollado principalmente para aplicaciones antibacterianas y de administración de fármacos.	Nominal Concentración 0.12%	Positivo Negativo

MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO

- Experimental y observacional. *In vitro*

UNIVERSO DE ESTUDIO

- Se utilizarán 32 órganos dentales uniradiculares humanos intactos con ápices rectos de un solo canal y maduros, extraídos recientemente por motivos ortodónticos o periodontales.
- Nanopartículas de plata.
- Nanopartículas de quitosano.

METODOLOGÍA

Materiales e instrumental

El disco diamantado para seccionar se obtuvo de la casa comercial (Komet, Brasseler, Lemgo, Alemania), se utilizaron limas tipo k 15 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza), los instrumentos rotatorios de instrumentación utilizados fueron sistema Edge Sequel Sapphire (Albuquerque, New México USA), los agentes irrigantes fueron hipoclorito de sodio 5.25% utilizado fue (Clorox) y ácido etilendiaminoteracético EDTA 17% (Sybron Endo, Ca), esmalte de uñas transparente. Se usó cultivo puro de *Enterococcus Faecalis* (ATCC 29212), caldo de infusión cerebro /corazón (BHI), una campana de flujo laminar (LABCONCO, Kansas City, MO USA.), micro túbulos Eppendorf , incubadora (Lab Line, Proveedor Científico S.A.), para el secado se utilizaron puntas de papel de la casa (Sybron Endo ,Ca) y para las medicaciones intraconducto se utilizó hidróxido de calcio (UltraCal Xs, Ultradent Products Inc. ,EE.UU.), mezclado con nanopartículas de plata o con nanopartículas quitosano y solución salina para el grupo control, para la colocación de estas medicaciones se utilizarán léntulos (Mani Inc, Tachigiken, Japón). Las muestras se enjuagaran y

neutralizaran con solución de ácido cítrico al 20%. Así mismo, se utilizarán limas Hedstroem del tamaño 30 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza) y solución salina fisiológica, un vórtice y placas de agar sangre.

Preparación de los dientes

Para este estudio, se recolectaron 32 órganos dentales uniradiculares humanos intactos con ápices rectos de un solo canal y maduros, extraídos recientemente. Los dientes se decoronaron debajo de la unión de cemento-esmalte, perpendicular al eje largo, utilizando un disco de diamante de lado seguro (Komet, Brasseler, Lemgo, Alemania) y la longitud radicular fue estandarizada a 15 mm. Las raíces se examinaron bajo un lazo de lupa para asegurar la ausencia de grietas. Se insertó una lima K de tamaño 15 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza) en los conductos radiculares hasta que fue visible en el foramen apical y la longitud de trabajo se estableció 1 mm más corta que esta longitud.

La instrumentación mecánica se realizó utilizando una secuencia del sistema Edge Sequel Sapphire (Albuquerque, New México USA), hasta un calibre 30/.04 como calibre apical. Se usó hipoclorito de sodio al 5.25% (NaOCl) para irrigación. Al final de la instrumentación, la capa de barrillo dentinariose eliminó utilizando 3 ml de ácido EDTA 17%, seguido de 5 ml de NaOCl al 5,25%, cada uno durante 5 minutos. Después del lavado final con 10 ml de solución salina fisiológica, los conductos se secaron con puntos de papel (Sybron Endo, Ca). Para prevenir la contaminación bacteriana externa, todas las superficies externas de los dientes se cubrieron con dos capas de esmalte de uñas, excepto el área de acceso. Las raíces se colocaron en tubos y luego se autoclavaron en 121 °C durante 30 minutos. Se obtuvieron cultivos de muestras para verificar la esterilización a los 7 días y se realizó una resiembra para verificación a los 14 días.

Infección del conducto radicular experimental

Se usó cultivo puro de *Enterococcus Faecalis* (ATCC 29212) como microorganismo de prueba. Las colonias bacterianas aisladas durante 24 horas se suspendieron en 5 ml de caldo de infusión de cerebro / corazón (BHI) y luego se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se transfirieron veinte µl de la suspensión bacteriana a cada canal bajo una campana de flujo laminar (LABCONCO, Kansas City, MO USA.). Luego los microtubos se volvieron a tapar y se incubaron a 37 °C durante 21 días.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Al final del período de incubación, el medio en el microtubo se aspiró asépticamente y los conductos se secaron utilizando puntas de papel estériles. En seguida, los órganos dentarios fueron separados al azar en 3 grupos experimentales (n = 8) y un grupo control (n = 8) y se colocaron las medicaciones intraconducto; cada grupo fue expuesto a las distintas medicaciones intraconducto, (grupo 1) compuesto por pasta de Ca(OH)_2 mezclada con suspensión de nanopartículas de quitosano, (grupo 2) pasta de Ca(OH)_2 , (grupo 3) pasta de Ca(OH)_2 mezclada con nanopartículas de plata; con una proporción 1:1 en los tres grupos experimentales y (grupo 4) grupo control con solución salina estéril. Los medicamentos se llevaron al conducto utilizando léntulos (Mani Inc, Tachigiken, Japón). El exceso de material se eliminó de las entradas de los canales. Luego se colocaron los dientes en microtubos estériles de 1,5 cc y los microtubos se sellaron. Después de la colocación de los diversos medicamentos, todos los grupos se subdividieron al azar en tres subgrupos iguales y se incubaron durante diferentes períodos de tiempo de 14 y 21 días a una temperatura de 37 °C y 100% de humedad. Se realizaron muestras al final del período de incubación, cada muestra se lavó con 5 ml de solución salina estéril para eliminar la medicación probada. Las muestras se enjuagaron y neutralizaron con 0.5 mL de solución de ácido cítrico al 20%. Luego se realizó una última irrigación con 1.0 mL de solución salina estéril.

Las muestras microbianas se obtuvieron de cada subgrupo en condiciones asépticas. Para este propósito, se limó circunferencialmente en el conducto con una lima Hedstrom estéril #30 (Mani Inc, Tachigiken, Japón) con giros a contra de las manecillas del reloj con una ligera presión. Luego se colocó una punta de papel estéril # 30 en el canal durante 60 segundos y se transfirió en los microtubos de prueba que contenían 1,0 ml de solución salina fisiológica y se agitó durante 30 segundos en un vórtice. Luego, se sembró una alícuota de 10 μ l de la suspensión microbiana en una placa de agar sangre. Los muestreos se realizaron para cada grupo y después de 24 horas de incubación, se registraron los números de unidades formadoras de colonias (UFC) (26-27)

RESULTADOS

Los órganos dentarios a utilizar se estandarizaron a 15 mm, fueron instrumentados con el sistema Edge Sequel Sapphire hasta un calibre 30/.04, los cuales fueron irrigados con solución de hipoclorito de sodio al 5.25% entre instrumentos, con una irrigación final de EDTA al 17% activada con ultrasonido, fueron secados con puntas de papel estéril y barnizados en su superficie externa para prevenir contaminación, éstos fueron autoclavados a 121°C por 30 minutos, para posteriormente tomar muestra para verificar su esterilización.



Figura 13: Estandarización a 15 mm cada grupo.

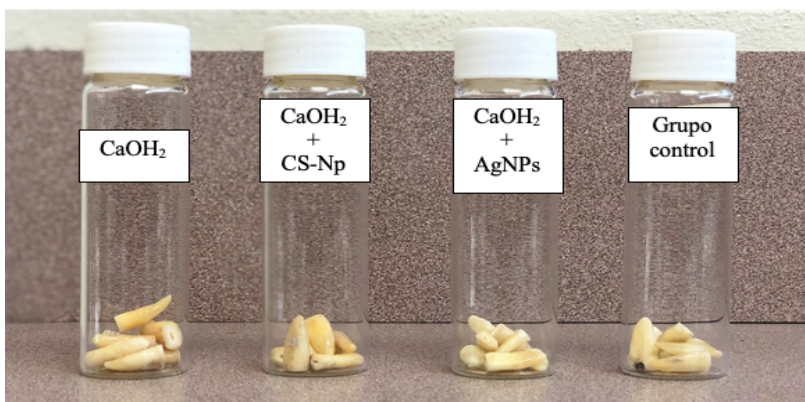


Figura 14: Subgrupos esterilizados.



Figura 15a, 15b: Fotografías de siembra de alícuotas del grupo control y grupos experimentales a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata y d) grupo control.

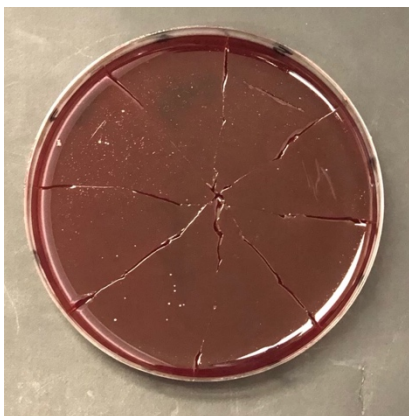


Figura 16: Fotografía de grupo control a las 24 horas de incubación a 37°C con 100% de humedad tras sembrado de una alícuota de $10\ \mu\text{L}$ de cada espécimen.



Figura 17a, 17b, 17c: Fotografía de grupos a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata pos inoculación con *E. Faecalis* a las 24 horas de incubación sin medicación.

Se realizó una incubación a 37 °C y 100% de humedad para obtener una muestra microbiológica madura con una concentración aproximada de 8×10^6 UFC/ mL a los 7 días.



Figura 18: Espectrofotómetro calculando la concentración aproximada a 8×10^6 UFC/ mL.

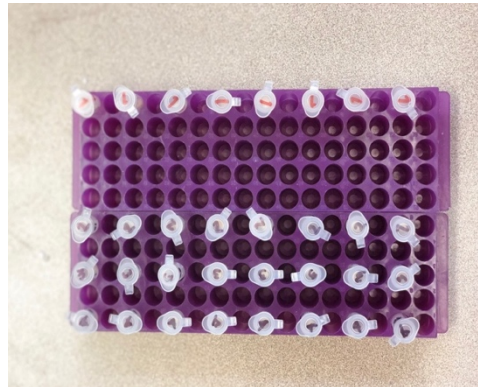


Figura 19: Microtubos con grupos experimentales a 7 días de incubación.

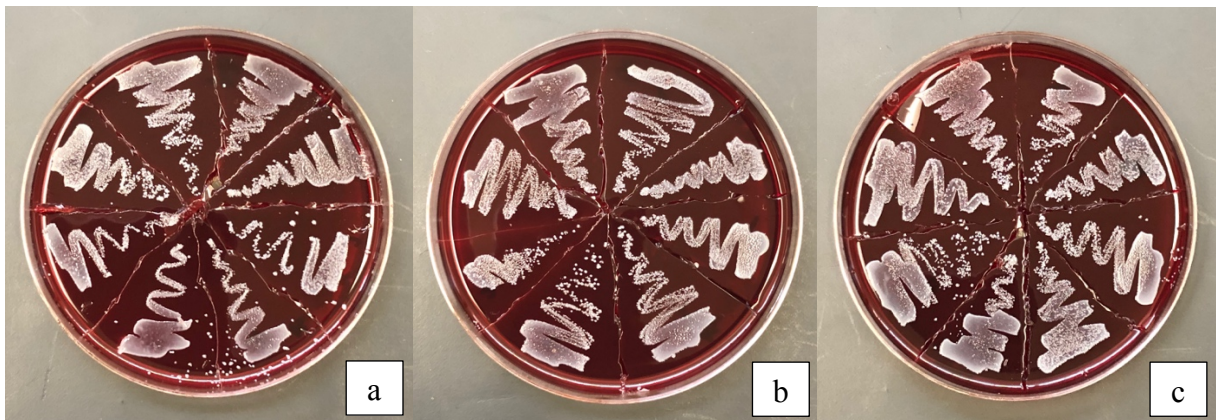


Figura 20a, 20b, 20c: Fotografía de grupos a) Compuesto CaOH_2 + nanopartículas de quitosano, b) grupo CaOH_2 , c) grupo Compuesto CaOH_2 + nanopartículas de plata pos inoculación con *E. Faecalis* a los 7 días de incubación sin medicación.

Con el propósito de verificar que el grupo control se mantuviera sin crecimiento bacteriano, se realizó una resiembra de 10 μL de cada espécimen, y se incubó por 24 horas para su posterior análisis.

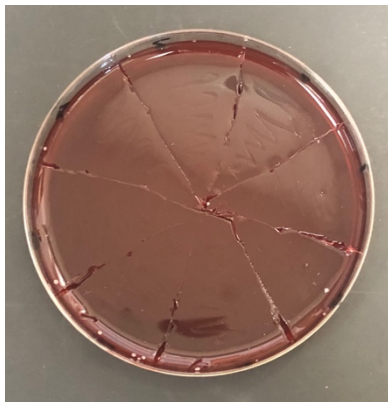


Figura 21: Resiembra de grupo control a los 14 días mostrando el grupo control estéril.

Una vez que las muestras microbiológicas concluyeron los 14 días de incubación, se procedió a la colocación de las medicaciones correspondientes a cada grupo: a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata. Para el procedimiento se mezclaron los componentes en una proporción 1:1 y con la ayuda de léntulos se introdujo la medicación a cada conducto y se eliminó el excedente de la entrada, cada órgano dentario se colocó en un microtubo y se taparon, seguido de una incubación de 21 días, se analizarán en dos periodos distintos 14 y 21 días.

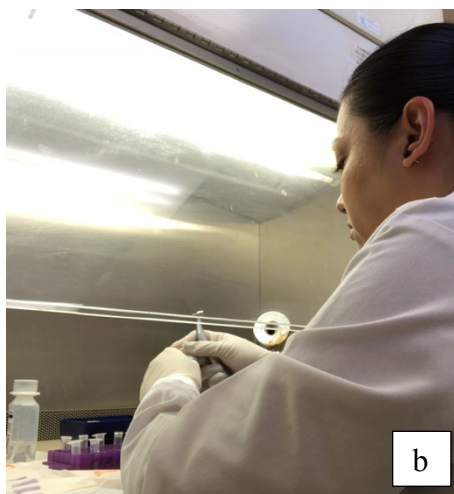
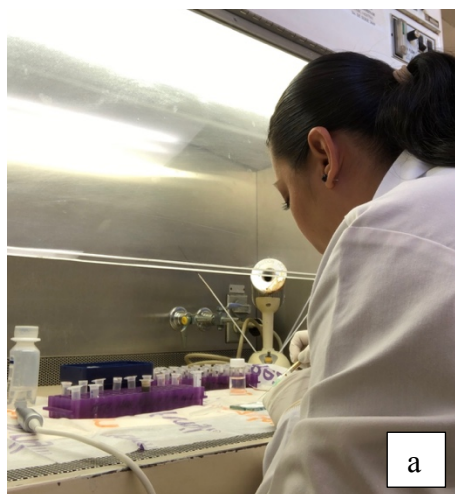


Figura 22a, 22b: Colocación de medicaciones correspondientes a cada subgrupo a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata con la ayuda de léntulos.

Posterior al periodo de incubación de 14 días se realizó una irrigación con 1 mL solución fisiológica estéril para remover la medicación , se neutralizaron con 0.5 mL de ácido cítrico y un limado circunferencial con lima tipo hedstrom con ligera presión en contra de las manecillas del reloj fue realizado, seguido de una irrigación final con 1 mL de solución fisiológica, se introdujo una punta de papel #30 estéril por 60 segundos y se transfirieron a un microtubo que contenía 1,0 mL de solución fisiológica, las cuales fueron centrifugadas por 30 segundos, un sembrado de alícuotas de 10 µL fue realizado de cada espécimen para su posterior incubación. Se puede apreciar claramente un cambio significativo a los 14 días en los tres grupos, mostrando ausencia de crecimiento bacteriano.



Figura 23: Materiales para la toma de muestra pos incubación 14 y 21 días.



Figura 24a, 24b: Toma de muestra para sembrado de alícuotas en condiciones asépticas en campana de flujo laminar.

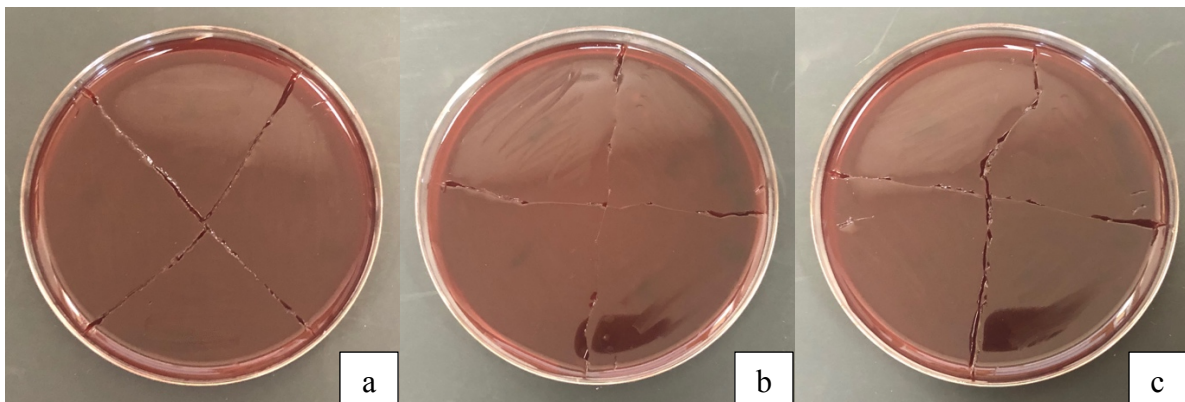


Figura 25a, 25b, 25c: Muestra de ausencia de crecimiento bacteriano en grupos con las medicaciones correspondientes: a) Compuesto Ca(OH)_2 + nanopartículas de quitosano, b) grupo Ca(OH)_2 , c) grupo Compuesto Ca(OH)_2 + nanopartículas de plata con un periodo de incubación con de 14 días.

RESULTADOS

En el segundo muestreo, a los 21 días se puede observar un crecimiento bacteriano correspondiente a $<10,000$ UFC/mL en los tres grupos experimentales, lo que evidencia que a este periodo se reinicia la actividad bacteriana.

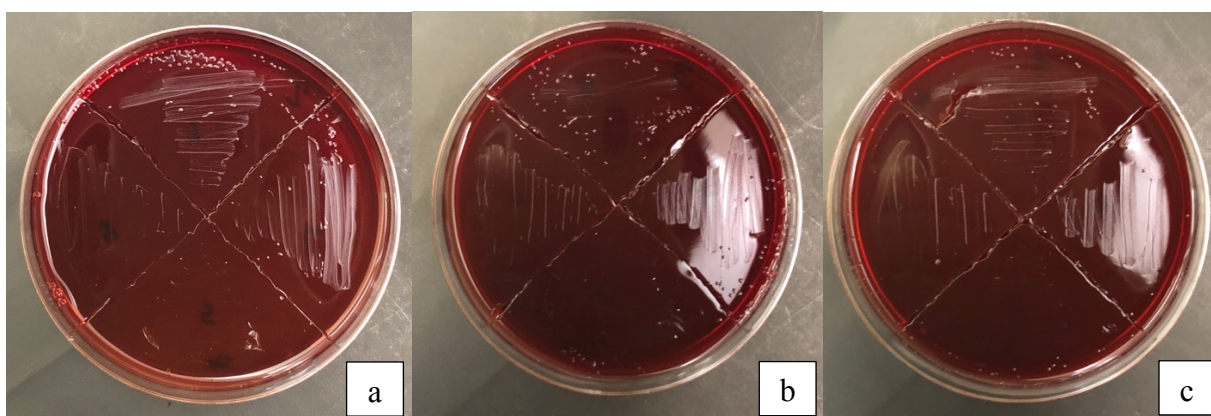


Figura 26a, 26b, 26c: Muestra de crecimiento bacteriano correspondiente a $<10,000$ UFC/mL en grupos: a) Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de quitosano, b) grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, c) grupo Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata con un periodo de incubación con de 21 días.

Tabla 3. Muestra resultados en ambos intervalos de tiempo pos tratamiento.

14 Días			
Compuesto	Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de quitosano	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata
Resultado	No mostró crecimiento bacteriano	No mostró crecimiento bacteriano	No mostró crecimiento bacteriano
21 Días			
Compuesto	Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de quitosano	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + nanopartículas de plata
Resultado	3 de 4 muestras mostraron crecimiento bacteriano	3 de 4 muestras mostraron crecimiento bacteriano	2 de 4 muestras mostraron crecimiento bacteriano

DISCUSIÓN

El *Enterococcus Faecalis* es una de las principales bacterias aisladas en las muestras de infecciones endodónticas debido a su capacidad de invadir los túbulos dentinarios y adherirse a las paredes del conducto radicular. Este microorganismo puede persistir aún después de haberse realizado un tratamiento de conductos y es capaz de resistir cambios de pH altamente básicos, así como periodos prolongados con pocos o nulos nutrientes (31).

Shabahang y col., en 2003 (32), mencionan que el *Enterococcus Faecalis* es frecuentemente el patógeno dominante en la periodontitis apical persistente, sugiriendo que ésta sola especie tiene el potencial para mantener una infección del conducto radicular y la lesión perirradicular. La utilización de un medicamento intraconducto con propiedades antibacteriales entre citas, disminuye o erradica la carga bacteriana del sistema de conductos e incrementa considerablemente el éxito del tratamiento de conductos (33). El hidróxido de calcio ha sido ampliamente usado en endodoncia como medicación intraconducto; su pH alto tiene efectos dañinos como la inactivación del sistema de transporte de la membrana sobre las propiedades biológicas de la pared celular, resultando tóxico para las bacterias (34).

Wu y col., 2014 (35) realizaron un estudio donde se evaluaron una solución al 0.1% cargada con nanopartículas de plata como irrigante y en forma de gel al 0.02% comparado con medicación de hidróxido de calcio y solución salina en el grupo control, donde se demostró que el gel utilizado como medicamento destruyó el biofilm de manera significativa. Esto se atribuye al periodo de interacción con el biofilm de las paredes dentinarias, una interacción a corto tiempo en forma de solución no elimina el biofilm.

En un estudio dirigido por Shaymaa y col., menciona que el Ca(OH)_2 combinado con solución de quitosano fue más efectiva en la inhibición del crecimiento bacteriano que cuando es comparada con Ca(OH)_2 mezclada con solución salina (30).

Ballal y col., 2010 concluyeron que la adición de quitosano a la pasta de hidróxido de calcio como medicación intraconducto promueve la liberación de iones por tiempo prolongado (36). En un estudio realizado por Shaik y col., (37) se concluyó que la adición de quitosano a la pasta de hidróxido de calcio hace más efectiva la inhibición de *Enterococcus Faecalis* y *C. Albicans* que cuando se realiza la pasta con solución salina.

La adición de nanopartículas de plata o quitosano al hidróxido de calcio muestra un efecto sinérgico al ser mezclado con un agente antimicrobiano bactericida aumentando su eficacia. Al estar en contacto por un tiempo prolongado, se logra que estas afecten de manera significativa la membrana celular de la bacteria, causando un aumento en la permeabilidad de la membrana, y finalmente, la muerte de la célula bacteriana.

El efecto antibacterial sinérgico de la medicación compuesta por Ca(OH)_2 + quitosano, promueve la inhibición, la entrada y recolonización de *Enterococo Faecalis* al sistema de conductos, elimina biofilm de las paredes dentinarias y no afecta el sellado de los cementos endodonticos permitiendo un sellado hermético, asegurando el éxito a largo plazo del tratamiento de conductos.

En el presente estudio podemos observar que claramente existe una inhibición bacteriana al utilizar la pasta compuesta por Ca(OH)_2 + AgNPs, lo que podemos traducir que la utilización de la solución de AgNPs como vehículo para la medicación logre una disrupción del biofilm de las paredes dentinarias y sea posible la remoción del mismo con la desinfección químico-mecánica.

Kim et al. (38)., han informado que la actividad antibacteriana de los AgNPs es el resultado de la formación de radicales libres. Los radicales libres originados en la superficie de las nanopartículas dañan la membrana celular.

Algunos estudios mencionan que la carga positiva en el ion es crucial por su actividad antimicrobiana a través de la electrostática. Atracción entre la membrana celular cargada negativa de Microorganismo y nanopartículas cargadas positivas (38).

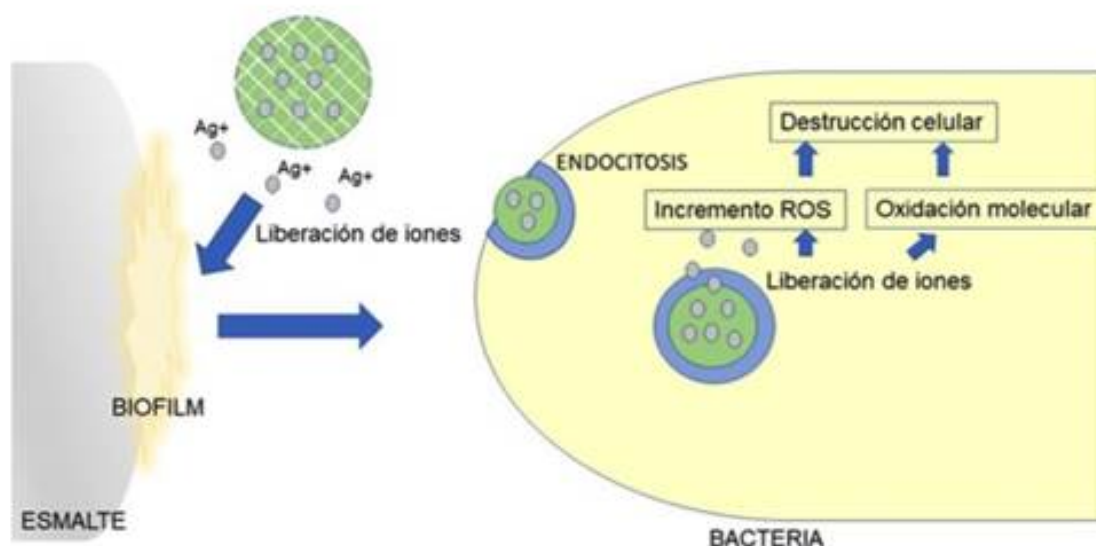


Figura 27: Muestra esquema de la actividad antimicrobiana de las Ag NPs.

El quitosán y sus derivados, como el quitosano carboximetilado, muestran un amplio rango de actividad antimicrobiana, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Los mecanismos exactos de la acción antibacteriana del quitosán y sus derivados aún no están vívidos. Sin embargo, un mecanismo propuesto más comúnmente es la muerte mediada por contacto que implica la atracción electrostática de quitosán cargado positivamente con las membranas celulares bacterianas cargadas negativamente.

Esto podría conducir a la alteración de la permeabilidad de la pared celular, lo que eventualmente provocaría la ruptura de las células y la fuga de los componentes proteínicos y otros componentes intracelulares. Rabea et al. propuso que el quitosano, debido a su propiedad quelante, secuestra metales / nutrientes esenciales e inhibe las actividades enzimáticas esenciales para la supervivencia de las células bacterianas. Bajo microscopía electrónica de transmisión, se observó que las células bacterianas

estaban completamente envueltas en el quitosano formando una capa impermeable. Esto podría haber resultado en la prevención del transporte de solutos esenciales que conducen a la muerte celular. En el caso de los hongos, el chitosán ingresa a las células y alcanza los núcleos, se une al ADN e inhibe la síntesis de ARN y proteínas. Las propiedades policatiónicas del quitosano, presentadas por los grupos de glucosamina $-NH_3^+$ cargados positivamente, pueden ser el factor principal que contribuye a su interacción con los componentes de la superficie de las bacterias cargados negativamente, dando lugar a extensas alteraciones de la superficie celular, fugas de sustancias intracelulares y, en última instancia, causando daños a las actividades vitales de las bacterias (39).

Los resultados con la nanopartículas de plata ($AgNP_s$) demuestran que son un potente agente antimicrobiano, en donde se han logrado avances en el conocimiento de los diferentes mecanismos de acción contra las bacterias (40). Su mecanismo de acción contra las bacterias Gram negativas (41), es la producción de unas perforaciones en la pared bacteriana, haciendo que la morfología de la membrana cambie, incrementando su capacidad permeable y facilitando la muerte celular (42).

La lisis bacteriana puede ser considerada como otra de las razones de esta propiedad, las $AgNP_s$ modulan el perfil de la fosfo-tirosina de los péptidos bacterianos, los cuales pueden afectar la señal bacteriana de transducción e inhibir el crecimiento de estas bacterias (43). Así también ha sido descrito que las $AgNP_s$ induce a una desnaturalización o a la oxidación de la pared celular la cual permite esta ruptura de los organelos que se encuentran dentro de ellas, resultando así la muerte bacteriana (44). Se han referido tres efectos de las $AgNP_s$ contra las bacterias Gram negativas; 1) las $AgNP_s$ dentro del rango de 1-10 nm se unen a la superficie de la membrana de la célula, alterando drásticamente su funcionamiento, así como la permeabilidad y la respiración. 2) las $AgNP_s$ son capaces de penetrar dentro de la bacteria y causar más daños por la posibilidad que tienen de interactuar con azufre y fósforo que son compuestos que contiene el ADN. 3) las $AgNP_s$ pueden liberar iones de plata, las cuales tienen una contribución adicional al efecto bactericida de las $AgNP_s$, ya que es más pronunciado contra organismos gram negativos que las gram-positivas (45).

En esta investigación, la actividad bactericida tanto de las nanopartículas de plata como de quitosano al ser adicionadas al hidróxido de calcio fue alta, mostrando un efecto elevado a los 14 días y decrecimiento a los 21 días, no obstante el nivel de eficacia no se vio afectado de una semana a otra de manera significativa, ya sea por la liberación de radicales libres por medio de las nanopartículas de plata o la actividad electrostática de las nanopartículas de quitosano, la actividad antibacteriana permaneció a lo largo del periodo de incubación. Al desintegrarse el biofilm de las paredes dentinarias se hace más fácil su remoción por medios químicos y mecánicos, logrando así una desinfección adecuada del sistema de conductos. En el caso de las bacterias, las bacterias gram positivas fueron más susceptibles que las gramnegativas.

El pH, el grado de desacetilación (DD), el peso molecular, las modificaciones químicas y la presencia de lípidos y proteínas son puntos importantes para la actividad antibacteriana. Se sabe que la DD influye en la actividad antibacteriana. Con una DD más alta, el número de grupos de amino aumenta por unidad de glucosamina y, por lo tanto, el quitosano muestra una mayor eficacia antibacteriana. En estudios se ha probado el grado de desinfección, la alteración de las bacterias biopelículas y la eficacia a largo plazo de estas nanopartículas contra *Enterococcus faecalis* en formas planctónicas y de biopelículas demostrando que la tasa de destrucción bacteriana por NP dependía de la concentración y la duración de la interacción.

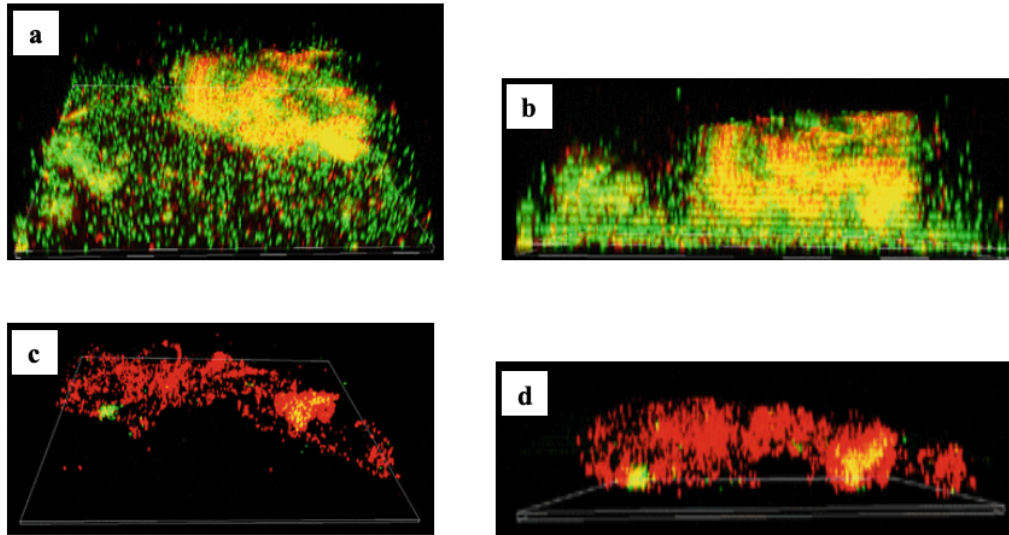


Figura 28a, 28b, 28c, 28d: Reconstrucción CLSM tridimensional de biofilm (a, b) de *E. faecalis* (ATCC 29212) y después del tratamiento con antibacteriano con CS-np (c,d). El número de células bacterianas vivas se redujo significativamente, y la estructura tridimensional se rompió (9).

CONCLUSIONES

- 1.- Se estandarizaron los diferentes procesos de extracción dental, instrumentación, infección del canal radicular y la aplicación de nanopartículas de plata y quitosano.
- 2.- El tratamiento con la aplicación de nanopartículas de plata en patologías endodónticas por infección con *Enterococcus faecalis* constituye una alternativa terapéutica útil cuando fracasa el tratamiento de forma convencional.
- 3.- El tratamiento con la aplicación de nanopartículas de quitosano en patologías endodónticas persistentes constituye una alternativa terapéutica útil cuando fracasa el tratamiento de manera convencional.
- 4.- La aplicación de nanopartículas de plata y quitosano mejora los procesos de desinfección, facilitando la eliminación de microorganismos y con ello una mejor reparación de la zona periapical.
- 5.- El modelo experimental *in vitro* de la infección del conducto radicular, cumple con los criterios clínicos de un proceso de infección del sistema de conductos como lo demuestran los resultados microbiológicos reportadas en el presente estudio.
- 6.- La adición de nanopartículas de plata y/o quitosano al hidróxido de calcio mejoró significativamente la eficacia antibacteriana de la medicación intraconducto lográndose una disminución de UFC demostrada, con un decrecimiento aproximado de 8×10^6 UFC/ mL como concentración inicial a $<10,000$ UFC/mL pos tratamiento.
- 7.- La adición de nanopartículas de plata y/o quitosano mantuvo la acción antibacteriana hasta un periodo de 21 días, lográndose una disminución significativa en el crecimiento de UFC.

RECOMENDACIONES

1. En caso de utilizar $\text{Ca}(\text{OH})_2$ de la casa comercial Ultradent Products Inc., se sugiere utilizar nanopartículas de quitosano liofilizadas para un mejor manejo clínico.
2. Para realizar la medicación intraconducto con las nanopartículas ya sea de plata o quitosano en presentación de suspensión, se sugiere utilizar $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en polvo, ya que al realizar la mezcla la consistencia es muy fluida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. José SI, Fernando G. Endodoncia Técnica y Fundamentos. Médica Pan. Buenos Aires; 2002.
2. Machado ME de L. Endodoncia ciencia y tecnología, Tomo I. 2016.
3. Sarah Kwang, DDS, MSD, Anita Aminoshariae, DDS, MS J, Harding, MS, Thomas A. Montagnese, DDS, MS and AM, DDS M. The Critical Time-lapse between Various Restoration Placements and Subsequent Endodontic Intervention. J Endod. 2014;40:1922–3.
4. Aline Martins Justo, DDS, MSc, Ricardo Abreu da Rosa, DDS Ms, Manuela Favarin Santini, DDS, MSc MBCF, MD, PhD, Jefferson Ricardo Pereira, DDS, PhD MA, Hungaro Duarte, DDS, PhD, and Marcus Vinicius Reis So D, PhD. Effectiveness of Final Irrigant Protocols for Debris Removal from Simulated Canal Irregularities. J Endod. 2014;40:2009–14.
5. Mancini M, Cerroni L, Iorio L et al. Smear layer removal and canal cleanliness using different irrigation systems (EndoActivator, EndoVac, and passive ultrasonic irrigation): field emission scanning electron microscopic evaluation in an in vitro study. J Endod. 2013;39:1456-60.
6. Cohen, Stephen & Hargreaves KM. Vías de la Pulpa. Elsevier M. 2011.
7. Estrela CR, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan M a, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002;13:113–7.
8. Dowling a, Clift R, Grobert N, Hutton D, Oliver R, O’neill O, et al. Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties. London R Soc R Acad Eng Rep. 2004;46(July):618–618.
9. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. J Endod. 2016;42(10):1417–26.

10. NorikoHiraishiDDS, PhD*†Cynthia K.Y.YiuBDS, PhD†Nigel M.KingBDS, MS, PhD†JunjiTagamiDDS, PhD*†Franklin R.TayBDS (Hons) P. Antimicrobial Efficacy of 3.8% Silver Diamine Fluoride and Its Effect on Root Dentin. *J Endod.* 36(6):1026–9.
11. Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, Angelo Cintra LT, Tendoro KV, Dalto LG, et al. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *J Endod.* 2010;36(10):1698–702.
12. del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, Bhagirath AY, Medapati MR, Lai C, et al. Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. *J Endod* [Internet]. 2017;43(8):1332–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.017>
13. Teresa G-Q, Miguel A-O, Genoveva H-P, S. A-TL. Nanopartículas de plata: Aplicaciones biomédicas. 2013.
14. Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Med J* [Internet]. 2012;48(3):133–40. Available from: <http://synapse.koreamed.org/DOLx.php?id=10.4068/cmj.2012.48.3.133>
15. Dalglish T, Williams JMG., Golden A-MJ, Perkins N, Barrett LF, Barnard PJ, et al. Propiedades antimicrobianas del hidróxido de calcio. *J Exp Psychol Gen.* 2007;136(1):23–42.
16. Fava, L., Saunders W. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J.* 1999;32:257-82.
17. Hosoya, N., Takahashi, G., Arai, T., Nakamura J. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. *J Endod.* 2001;27:343–6.
18. Rivera, E., Williams K. Placement of calcium hydroxide in simulated canals:

- Comparison of glycerin versus water. *J Endod.* 1994;20:445–8.
19. Siqueira, J., Lopes H. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide. *Int Endod J.* 1999;32:361-69.
 20. Ozcelik, B., Tasman, F., Ogan C. A comparison of the surface tension of calcium hydroxide mixed with different vehicles. *J Endod.* 2000;26:500–2.
 21. Simon, S., Bhat, K., Francis R. Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80:459-64.
 22. B. M. MURRAY B. The Life and Times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(1):46–65.
 23. MORRISON D., Woodford N. CB. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J Appl Microbiol Symp Supl.* 1997;83(89–99).
 24. WOOD, Brian J. and Holzapfel WH. The Lactic Acid Bacteria: The general of lactic acid bacteria. 2AD.
 25. BILLSTRÖM H. Molecular epidemiology of clinical Enterococcus faecium. 2008.
 26. Murray Patrick R., Rosenthal Ken. PMA. Microbiología Médica. 7ma ed. Elsevier Inc., editor. Barcelona, España: Elsevier Inc.; 2013. 872 p.
 27. PORTENIER I, WALTIMO T HM. Enterococcus faecalis:-the root canal survivor and “star” in post treatment disease. *Endod Top.* 2003;6:135–59.
 28. Siqueira JF Jr RI. Polymerase chain reactionbased analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *iol Endod* 2004; 97: 85–94. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97:85–94.
 29. Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Salehi Y FM. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against Enterococcus faecalis. *J Endod.* 2015;43:1573–9.

30. Elsaka, S. E., & Elnaghy AM. Antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chitosan solutions and the outcomes on the bond strength of RealSeal sealer to radicular dentin. J Biomed Res [Internet]. 2012;26(3):193–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596069/>
31. Waltimo T, Ørstavik D, Sirén E HM. In vitro yeast infection of human dentin. J Endod. 2000;26(4):207–9.
32. Shabahang S TM. Effect of MTAD on Enterococcus faecalis. –Contaminated Root Canals of Extracted Human Teeth. J Endod. 2003;29(9):576–9.
33. Byström A, Claesson R SG. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol. 1985;1(5):170–5.
34. George S, Kishen A SK. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by Enterococcus faecalis. J Endod. 2005;31:867–72.
35. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against Enterococcus faecalis Biofilm. J Endod [Internet]. 2014;40(2):285–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022>
36. Ballal NV, Shavi GV, Kumar R, Kundabala M BK. In vitro sustained release of calcium ions and pH maintenance from different vehicles containing calcium hydroxide. J Endod. 2010;36:862–6.
37. Shaik Jaheer, Garlapati Roopadevi, Nagesh Bolla, Sujana Varri, Jayaprakash Thumu NS. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of triple antibiotic paste and calcium hydroxide using chitosan as carrier against Candida albicans and Enterococcus faecalis: An in vitro study. J Conserv Dent. 2014;17(4):335–9.
38. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ et al. Antimicrobial effects of

- silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007;3:95–101.
39. Raafat D SH. Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. *Microb Biotechnol*. 2009;2:186–201.
 40. Kon K RM. Metallic nanoparticles: mechanism of antibacterial action and influencing factors . *J Comp Clin Path Res*. 2013;1:160–74.
 41. McQuillan JS, Groenaga Infante H, Stokes E SA. Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in *Escherichia coli* K12. *Nanotoxicology*. 2012;6(857–66).
 42. Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*. 2006;5:916–24.
 43. Durán N, Marcato PD, De Conti R, Alves OL, Costa FTM MB. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J Braz Chem Soc*. 2010;21:949–59.
 44. Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem*. 2007;12:527–34.
 45. Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A EM. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol*. 2011;162:542–9.

