



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS E INGENIERIA

Maestría en Ciencias de la Salud

TESIS

"Prototipo de biosensor para la identificación bacteriana rápida en endodoncia".

CDEE. IVAN OLIVARES ACOSTA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. BERTHA LANDEROS SANCHEZ

CO-DIRECTORA

DRA. LILIA ANGELICA HURTADO AYALA

Tijuana, B. C. 05 de junio 2019

INDICE

1. RESUMEN.....	3
2. ABSTRACT.....	4
3. INTRODUCCION.....	5
4. ANTECEDENTES.....	7
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
6. JUSTIFICACION.....	19
7. HIPOTESIS.....	19
8. OBJETIVO GENERAL.....	20
9. MATERIALES Y METODOS.....	21
10. RESULTADOS Y DISCUSION.....	26
11. CONCLUSIONES.....	38
13. REFERENCIAS.....	39

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: la eliminación completa de microorganismos presentes dentro del sistema de conductos radiculares es esencial para el éxito de la terapéutica endodóntica, Sin embargo, los métodos actuales para evaluar la persistencia bacteriana después de la limpieza, conformación y antes de la obturación no son empleados de forma rutinaria. Los biosensores son instrumentos que nos permiten medir parámetros químicos y biológicos como bacterias, además los resultados se pueden obtener en un marco de tiempo clínicamente relevante de 5 minutos. El objetivo de este estudio fue diseñar un prototipo de biosensor capaz de determinar en tiempo real la presencia bacteriana. **METODOS:** se realizó la síntesis de Nanopartículas de plata, usando nitrato de plata y como agente reductor citrato trisódico, se realizó caracterización de UV visible, DLS, potencial z y Microscopia electrónica de transmisión, posteriormente se funcionalizaron las nanopartículas de plata con un antiácido- lipoteicoico, al cual previamente se le había ligado Fluoresceína. **RESULTADO:** La unión entre los anticuerpos y la fluoresceína se produjo como es descrito en la literatura por uniones débiles, y la posterior funcionalización de la nanopartícula de plata se produjo de forma espontánea por la característica de todas las proteínas de coronar a las nanopartículas, los tres elementos juntos forman un biosensor capaz de detectar presencia bacteriana **CONCLUSION:** Consideramos que la disponibilidad del biosensor como un kit de prueba de diagnóstico rápido en el consultorio, será útil para que el odontólogo sea capaz de determinar de forma objetiva cuando es el momento ideal para obturar, sin embargo, se deberán realizar más estudios para determinar la eficacia del mismo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: the complete elimination of microorganisms present within the root canal system is essential for the success of endodontic therapy, however, current methods to evaluate bacterial persistence after cleaning, shaping and before filling are not used. The biosensors are instruments that allow us to measure chemical and biological parameters such as bacteria, in addition the results can be obtained in a clinically relevant time frame of 5 minutes. The objective of this study was to design a biosensor prototype able to determine bacterial presence in real time. **METHODS:** the synthesis of silver nanoparticles was performed, using silver nitrate and as reducing agent trisodium citrate, characterization of visible UV, DLS, z potential and transmission electron microscopy was carried out, later the silver nanoparticles were functionalized with an anti-lipoteichoic acid, to which Fluorescein had previously been bind. **RESULT:** The binding between the antibodies and the fluorescein was produced as described in the literature by weak forces, and the subsequent functionalization of the silver nanoparticle occurred spontaneously because of the characteristic of the protein to crown the nanoparticle. The three elements together form a biosensor capable of detecting bacterial presence **CONCLUSION:** We consider that the availability of the biosensor as a rapid diagnostic test kit in the office, will be useful for the dentist to be able to determine objectively when it is the ideal time to filling. However, more studies should be done to determine its efficacy.

INTRODUCCION

La pulpa dental es un tejido conectivo laxo muy especializado contenida por tejidos que la protegen del medio ambiente que la rodea, en condiciones normales es estéril, sin embargo, bajo ciertas circunstancias puede degenerar y convertirse en un tejido necrótico, lo que la hará susceptible a ser colonizada rápidamente por microorganismos que se encuentra de forma habitual en la cavidad oral. Esto producirá un proceso inflamatorio a nivel apical llamada periodontitis apical (PA) (1). Aunque los factores químicos y físicos pueden inducir inflamación a nivel perirradicular, La evidencia científica indica que la infección endodóntica es esencial para la progresión y la perpetuación de las diferentes formas de PA (2). Debido a que la periodontitis apical es una enfermedad infecciosa, el objetivo del tratamiento endodóntico es erradicar la infección que ocurre o evitar que los microorganismos infecten o reinfecten los conductos radiculares. Hongos y, más recientemente, arqueas y virus han sido asociados con infecciones endodónticas, sin embargo, las bacterias son los microorganismos implicados en la patogénesis de la periodontitis apical (3).

El objetivo primario de la endodoncia es preservar la integridad de las estructuras periapicales y en caso de esta no existir dar los medios propicios para que esta regrese a su estado de salud (1). Esto se logra con una adecuada limpieza y conformación y una subsecuente obturación del sistema de conductos radiculares(SCR),La eliminación de la gran mayoría de bacterias presentes se asocia a un índice alto de éxito, y grandes cantidades de bacterias remanentes son la principal causa de fracaso en endodoncia(4).Las endodoncias en una sola visita se han convertido en una opción muy popular entre los endodncistas ya que ahorra tiempo al operador y al paciente, además de estar asociado con menores agudizaciones, menor dolor post operatorio y disminución del riesgo de una contaminación entre citas, sin embargo erradicar completamente las bacterias dentro del SCR en una sola cita puede ser imposible por la dificultad de alcanzar todas las áreas, por otra parte la endodoncia en múltiples visitas implica el uso de agentes antimicrobianos como el Hidróxido de calcio que en teoría reduciría la carga bacteriana antes de la obturación, y aunque lógicamente la endodoncia en múltiples citas debería de tener una incidencia mayor de éxito, las investigaciones actuales han arrojado resultados contradictorios(5).

ANTECEDENTES

La primera observación registrada de bacterias en el conducto radicular se remonta al siglo XVII y al constructor aficionado de microscopios holandés Antony van Leeuwenhoek. Él informó que en los conductos del SCR de un diente cariado se podía observar una materia blanda y que todo el material parecía estar vivo (6). Pasaron casi 200 años hasta que se confirmó su observación y se sugirió una relación de causa y efecto entre las bacterias y la periodontitis apical. Willoughby Dayton Miller, un dentista estadounidense, publicó un hito que reportaba la asociación entre las bacterias y la periodontitis apical después de un análisis de muestras recolectadas de conductos radiculares (7). Por medio de la bacterioscopia de las muestras del conducto, encontró células bacterianas en las tres morfologías básicas conocidas en ese momento: cocos, bacilos y espirilos. Morfológicamente, la microbiota endodóntica fue claramente diferente en los tercios coronal, medio y apical del conducto. Las espiroquetas se encontraron en altas frecuencias en casos de abscesos y se sospechó un papel patógeno para estas bacterias (7). Aproximadamente 70 años después del estudio clásico de Miller, sus suposiciones fueron confirmadas por un elegante estudio de Kakehashi, el investigo la respuesta de las pulpas dentales expuestas a la cavidad oral en

ratas convencionales y libres de microorganismos. Se realizó una evaluación histológica y reveló que en todas las ratas convencionales se desarrollaron necrosis pulpar y periodontitis apical; sin embargo, las pulpas expuestas de ratas libres de microorganismos no solo siguieron siendo vitales, sino que también se repararon con la formación de tejidos duros. Un tejido similar a la dentina selló el área de exposición y aisló nuevamente las pulpas de la cavidad oral (2). Möller también proporcionó pruebas sólidas sobre la causa microbiana de la periodontitis apical. Su estudio con dientes de monos demostró que solo las pulpas desvitalizadas que estaban infectadas indujeron lesiones de periodontitis apical, mientras que las pulpas desvitalizadas y no infectadas mostraron una ausencia de cambios patológicos significativos en los tejidos perirradiculares. Además de corroborar la importancia de los microorganismos para el desarrollo de la periodontitis apical, este estudio también confirmó que el tejido de pulpa necrótica *per se* no puede inducir y mantener una lesión de periodontitis apical (8).

El microbiota endodóntico ha sido investigado tradicionalmente por métodos de cultivo microbiológico. El cultivo es el proceso de propagación de microorganismos en el laboratorio al proporcionarles los nutrientes necesarios y las condiciones fisicoquímicas adecuadas, incluida la temperatura, la

humedad, la atmósfera, la concentración de sal y el pH (9). Los análisis de cultivos de infecciones endodónticas han proporcionado una gran cantidad de información sobre la etiología de la periodontitis apical, la composición de la microbiota endodóntica en diferentes afecciones clínicas, los efectos de los procedimientos de tratamiento en la eliminación microbiana, las susceptibilidades de los microorganismos endodónticos a los antibióticos, etc. sin embargo, algunas limitaciones importantes de los métodos de cultivo hacen que un análisis exhaustivo de la microbiota endodóntica sea difícil de lograr(9). Las dificultades para cultivar o identificar muchas especies microbianas son de especial preocupación. Desafortunadamente, no todos los microorganismos pueden cultivarse en condiciones artificiales, y esto se debe simplemente a que las necesidades nutricionales y fisiológicas de la mayoría de los microorganismos son aún desconocidas (10). Las investigaciones de muchos ambientes acuáticos y terrestres que utilizan métodos independientes de la cultura han revelado que los miembros cultivables de estos sistemas representan menos del 1% del total de la población existente. Además, del 50% al 80% de las especies bacterianas que componen la cavidad bucal, representan bacterias desconocidas y aún sin cultivar (10).

Para evitar las limitaciones del cultivo, las herramientas y los procedimientos basados en la biología molecular están disponibles y han mejorado sustancialmente la capacidad de lograr una descripción más realista del mundo microbiano sin la necesidad de cultivo, La tecnología molecular también se ha aplicado para identificar confiablemente bacterias cultivadas, incluidas cepas con comportamiento fenotípico ambiguo o aberrante, aislados raros, bacterias poco caracterizadas o no caracterizadas y especies recientemente nombradas(11).

Los enfoques moleculares para la identificación microbiana se basan en ciertos genes que contienen información reveladora sobre la identidad microbiana. De los varios genes que se han elegido como dianas para la identificación bacteriana, el gen 16S rRNA (o 16S rDNA) ha sido el más utilizado porque está distribuido universalmente entre las bacterias, es lo suficientemente largo como para ser altamente informativo y lo suficientemente corto como para ser fácilmente secuenciado, posee regiones conservadas y variables, y ofrece confiabilidad para inferir relaciones filogenéticas (12).

Los datos de las secuencias del gen 16S rRNA se pueden usar para la identificación precisa y rápida de especies bacterianas conocidas y desconocidas, utilizando técnicas que no requieren cultivo. El gen de ARN 16S de prácticamente todas las especies bacterianas en un entorno dado, incluidas las bacterias aún no cultivadas y no caracterizadas, puede amplificarse por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores de amplio rango (o universales) que son complementarios de las regiones conservadas de este gen. La secuenciación de las regiones variables flanqueadas por los cebadores de amplio rango proporcionará información para una identificación bacteriana precisa. Los cebadores o sondas que son complementarios a regiones variables también pueden diseñarse para detectar especies objetivo-específicas directamente en muestras clínicas (13,14).

los métodos de identificación basados en el ADN, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sufren de altas lecturas falsas positivas por parte de Detección de ADN de células bacterianas muertas. Recientemente, se ha asumido que la detección de ARN por PCR con transcriptasa inversa es una mejor alternativa al ADN para medir bacterias viables. Se argumenta que los ARN son más lábiles y poseen una vida media más corta que el ADN, lo que

proporciona un mejor indicador de células viables. sin embargo, el La detección de bacterias viables mediante el método de PCR con transcriptasa inversa también es complejo y requiere múltiples pasos de procesamiento. (15) La necesidad de poder determinar el grado de limpieza presente ante de obturar el **SCR**, podría ser resuelta con el uso de un biosensor de identificación rápida.

Un biosensor es un dispositivo que mide reacciones biológicas o químicas generando señales proporcionales a la concentración de un analito en la reacción. Los biosensores se emplean en aplicaciones tales como monitoreo de enfermedades, descubrimiento de fármacos y detección de contaminantes, microorganismos causantes de enfermedades y marcadores que son indicadores de una enfermedad en los fluidos corporales (sangre, orina, saliva, sudor. (16) Un biosensor típico contiene los siguientes componentes:

Bioreceptor: una molécula que reconoce específicamente el analito se conoce como un bioreceptor. Las enzimas, células, ácido desoxirribonucleico (ADN) y anticuerpos son algunos ejemplos de bioreceptores. El proceso de generación de señal (en forma de luz, calor, pH, carga o cambio de masa, etc.) tras la

interacción del biorreceptor con el analito se denomina reconocimiento biológico.

Transductor: el transductor es un elemento que convierte una forma de energía en otra. En un biosensor, el papel del transductor es convertir el evento de bio-reconocimiento en una señal medible. Este proceso de conversión de energía se conoce como señalización. La mayoría de los transductores producen señales ópticas o eléctricas que generalmente son proporcionales a la cantidad de interacciones analito-bioreceptor.

Electrónica: esta es la parte de un biosensor que procesa la señal transducida y la prepara para su visualización. Consiste en un complejo circuito electrónico que realiza el acondicionamiento de la señal, como la amplificación y la conversión de señales analógicas a digitales. Las señales procesadas son cuantificadas por la unidad de visualización del biosensor (16).

El biosensor que proponemos usa como bioreceptor anticuerpos, como interfaz eléctrica nanopartículas de plata y como procesador de señal cromóforos.

Los anticuerpos son proteínas circulantes que se producen en los vertebrados en respuesta a la exposición a estructuras extrañas conocidas como antígenos.

Los anticuerpos son increíblemente diversos y específicos en su capacidad para reconocer estructuras moleculares extrañas, y son los principales mediadores de la inmunidad humoral contra todas las clases de microorganismos. Todas las moléculas de anticuerpo comparten las mismas características estructurales básicas, pero muestran una variabilidad acentuada en las regiones que se unen a los antígenos. Esta variabilidad de las regiones que se unen al antígeno es responsable de la capacidad de diferentes anticuerpos de unirse a un número enorme de antígenos con una estructura diversa. Las dos cadenas ligeras y las dos cadenas pesadas contienen una serie de unidades repetidas, homólogas, cada uno de unos 110 aminoácidos de longitud, que se pliegan independientemente en una estructura globular que se llama dominio de Ig. Las cadenas pesadas y ligeras constan de regiones amino terminales variables que participan en el reconocimiento del antígeno y de regiones carboxilo terminales constantes. Las regiones constantes de las cadenas pesadas median las funciones efectoras. La mayoría de las diferencias en la secuencia y la variabilidad entre diferentes anticuerpos se limitan a tres secuencias cortas en la región variable de la cadena pesada y a tres secuencias en la región variable de la cadena ligera. Estas secuencias diversas se llaman segmentos hipervariables. Las regiones hipervariables tienen cada una unos 10

aminoácidos de longitud y se mantienen en su lugar mediante secuencias estructurales más conservadas que forman el dominio de Ig de la región Variable. La limitación de la variabilidad de la secuencia a los tres tramos cortos permite mantener la estructura básica de todos los anticuerpos a pesar de la variabilidad entre diferentes anticuerpos (17).

las nanopartículas de plata son pequeñas partículas de entre 1 nm y 100 nm de tamaño. Aunque frecuentemente se describe como plata, algunos están compuestos de un gran porcentaje de óxido de plata debido a la gran proporción de átomos de plata de superficie a gran volumen. Se pueden sintetizar numerosas formas de nanopartículas dependiendo de la aplicación en cuestión. Las nanopartículas esféricas de plata son la forma más común. Su área de superficie extremadamente grande permite la coordinación de una gran cantidad de ligandos. Las propiedades de las nanopartículas de plata aplicables a los tratamientos humanos están siendo investigadas en estudios de laboratorio y en animales, evaluando la eficacia, la toxicidad y los costos (18).

Los métodos más comunes para la síntesis de nanopartículas son los químicos, o la nucleación de partículas dentro de una solución. Esta nucleación se produce cuando un complejo de iones de plata, generalmente AgNO_3 o

AgClO_4 , se reduce a plata coloidal en presencia de un agente reductor. Cuando la concentración aumenta lo suficiente, los iones de plata metálicos disueltos se unen para formar una superficie estable. La superficie es energéticamente desfavorable cuando el grupo es pequeño, porque la energía obtenida al disminuir la concentración de partículas disueltas no es tan alta como la energía que se pierde al crear una nueva superficie. Cuando el grupo alcanza un cierto tamaño, conocido como radio crítico, se vuelve energéticamente favorable y, por lo tanto, lo suficientemente estable como para seguir creciendo. Este núcleo luego permanece en el sistema y crece a medida que más átomos de plata se difunden por la solución y se adhieren a la superficie, Cuando la concentración disuelta de plata atómica disminuye lo suficiente, ya no es posible que suficientes átomos se unan para formar un núcleo estable. En este umbral de nucleación, las nuevas nanopartículas dejan de formarse y la plata disuelta restante se absorbe por difusión en las nanopartículas en crecimiento en la solución específica. A medida que las partículas crecen, otras moléculas en la solución se difunden y se unen a la superficie. Este proceso estabiliza la energía de la superficie de la partícula y bloquea que los nuevos iones de plata lleguen a la superficie. La unión de estos agentes estabilizadores disminuye la velocidad y finalmente

detiene el crecimiento de la partícula. Los ligandos que bloquean más comunes son citrato trisódico y polivinilpirrolidona (PVP), pero muchos otros también se usan en condiciones variables para sintetizar nanopartículas con tamaños, formas y propiedades de superficie particulares. Hay muchos métodos diferentes de síntesis química, incluido el uso de azúcares reductores, reducción de citrato, reducción a través de borohidruro de sodio, la reacción de espejo de plata, crecimiento mediado por semilla, y crecimiento mediado por la luz. Cada uno de estos métodos, o una combinación de métodos, ofrecerán diferentes grados de control sobre la distribución de tamaños, así como también distribuciones de disposiciones geométricas de la nanopartícula. La Caracterización es una parte importante en la síntesis de las nanopartículas de plata ya que nos permite conocer las características específicas de las mismas, el método empleado más comúnmente es UV visible que nos permite conocer la longitud de onda a partir del plasman superficial, esto ha sido muy bien estudiado e incluso se puede conocer el tamaño de la nanopartícula de plata determinando la absorbancia y longitud de onda en un espectrofotómetro, El DLS nos permite conocer el tamaño de la nanopartícula , Potencial Z las cargas disponibles que

presenta para poder ser unida a otras moléculas y El microscopio electrónico de superficie nos permite observar la forma y tamaño de la nanopartícula(19).

Un cromóforo es la parte o conjunto de átomos de una molécula responsable de su color. También se puede definir como una sustancia que tiene electrones capaces de absorber energía y excitarse, a diferentes longitudes de onda. Los cromóforos son, en química orgánica, los grupos no saturados responsables de la absorción en el UV. Esta absorción de radiación UV es el resultado de la excitación de electrones hacia estados de mayor energía. El núcleo juega un papel fundamental, ya que determina la fuerza con la cual estos electrones están unidos a él, y por ende influye en la magnitud de este cambio de energía. Cuando una molécula absorbe ciertas longitudes de onda de luz visible y transmite o refleja otras, la molécula tiene un color. Un cromóforo es una región molecular donde la diferencia de energía entre dos orbitales moleculares cae dentro del rango del espectro visible. La luz visible que incide en el cromóforo puede también ser absorbida excitando un electrón a partir de su estado de reposo. En las moléculas biológicas útiles para capturar o detectar energía lumínica, el cromóforo es la semimolécula que causa un cambio en la conformación del conjunto al recibir luz(20).

PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA

No existe ningún método objetivo para establecer en tiempo real si el sistema de conductos radiculares ha sido desinfectado de una forma efectiva antes de poder obturarlo, y así asegurar el éxito del tratamiento endodóntico.

JUSTIFICACIÓN

1. El sensor permitiría poder tomar decisiones clínicas más eficientes.
2. El pronóstico del tratamiento de conductos sería más predecible

HIPÓTESIS

Hipótesis 0

El biosensor nos permite identificar bacterias dentro del SCR

Hipótesis 1

El biosensor no es capaz de identificar bacterias

OBJETIVOS

Desarrollar un Biosensor que permita identificar la presencia bacteriana en el sistema de conductos radiculares en tiempo real.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Sintetizar nanopartículas de platas(AgNP)
2. Caracterización de AgNP mediante Uv visible, potencial,DLS y microscopia de transmision.
3. Funcionalizar el anti-acido lipoteicoico(AA) a las AgNP.
4. Caracterización del complejo AA-AgNP mediante Uv visible, potencial,DLS y microscopia de transmisión.
5. Unir la Fluoresceína (F) al complejo AA-AgNP
6. Caracterización del complejo AA-AgNP-F mediante Uv visible, potencial, DLS y microscopia de transmisión.
7. Immersion de puntas de papel protaper F2 en el complejo AAL-AgNP-F.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Nitrato de plata AgNO_3 (Sigma-aldrich)

Citrato trisódico(Sigma-aldrich)

Agua HPLC(BeScience)

Antiacido lipoteicoico(sigma-aldrich)

Fluoresceína(sigma-aldrich)

Puntas de papel protaper F2(Dentsply)

Potenciómetro

Espectofotometro (DR 5000)

Zetasiser nano(Malvern)

Microscopio electrónico de transmisión(Hitachi H7500)

METODOLOGIA

Síntesis y caracterización de AgNP

Los AgNP se sintetizaron por el método de reducción química. El procedimiento de síntesis fue el descrito por Lee & Miesel(22). Se calentaron cien ml de nitrato de plata ($1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) en un agitador magnético de placa caliente a 353 grados Kelvin; Se añadió gota a gota citrato trisódico (50 ml) al 1 por ciento, hasta que la solución incolora se volvió amarilla. El cambio de color indica la formación de AgNP . Se realizo lectura de pH con el potenciómetro.

La caracterización de espectro UV-visible se llevó a cabo en el espectrofotómetro (DR 5000) en un rango de 200 a 600 nm, usando una celda de cuarzo, como blanco se uso agua HPLC.

La caracterización de DLS se realizó en el equipo zetasiser, a una temperatura de 25°C con una duración de 60 segundos, una posición de medición de 2.00 mm, un rango de conteo 216.6 Kcps, se usó una celda de poliestireno.

La caracterización por microscopia electrónica de transmisión se realizó con el microscopio Hitachi H7500 con una exposición de 2 segundos, magnificación 1000 x y un voltaje de 80kvs

Unión y caracterización del ácido lipoteicoico con las AgNP

Se realizaron modificaciones a la técnica descrita por mariam y Dronge(22), se hizo un cambio de proteína(albumina por AA). El antiácido lipoteicoico monoclonal se colocó en un buffer de fosfato a un pH de 7.4, concentración de 1×10^{-3} , la cual permaneció constante. Las concentraciones de AgNP fueron 5×10^{-7} y 1×10^{-6} , por cada ml de solución de AA se agregó un ml de solución de AgNP(relación 1:1), la solución de la concentración de AgNP 5×10^{-7} se mantuvo en agitación durante 30 min y la solución de la concentración de AgNP de 1×10^{-6} se mantuvo en agitación durante 30 min y 120 horas para determinar si existe mayor unión al estar expuesto durante más tiempo.

Los espectros UV-visibles de antiácido lipoteicoico y antiácido lipoteicoico en presencia de concentraciones variables de AgNP se registraron en el rango de longitud de onda de 200-600 nm en un espectrofotómetro (DR5000), como blanco se usó agua HPLC.

La caracterización de DLS se realizó en el equipo zetasiser ,a una temperatura de 25°C ,con una duración de 60 segundos, una posición de

medición de 2.00 mm, un rango de conteo 216.6 Kcps, se usó una celda de poliestireno.

La caracterización por microscopia electrónica de transmisión se realizó con el microscopio Hitachi H7500 con, exposición de 2 segundos, magnificación 1000 x y un voltaje de 80kvs.

Union de Flouresceina con el complejo AgNP-AA

Se uso la técnica descrita por Voos y lopatin(23), primero se unió la F a el AA, se añadió 1 mg de isotiocianato de fluoresceína por 5 ml AA con una concentración de 1×10^{-3} , se agito en la incubadora por 48 horas a 37°C y se protegió de la luz. La F y otros subproductos que no reaccionaron se eliminaron filtrando la solución.

La caracterización de espectro UV-visible se llevó a cabo en el espectrofotómetro (DR 5000) en un rango de 300 a 700 nm, usando una celda de cuarzo y como blanco agua HPLC.

La caracterización de DLS se realizó en el equipo zetasiser ,a una temperatura de 25°C ,con una duración de 60 segundos, una posición de medición de 2.00 mm, un rango de conteo 216.6 Kcps, se usó una celda de poliestireno.

Posteriormente se llevo a cabo la unión de las AgNP con el complejo AA-F usando la técnica descrita anteriormente para la union de la AgNP y AA(22), se usaron las mismas técnicas de caracterización usadas para el complejo AA-F.

Finalmente se sumergen los conos protaper F2 en el complejo AgNP-AA-F por un minuto, se dejan secar y se colocan en frascos estériles, todo este proceso se realiza en la campana de vacío.

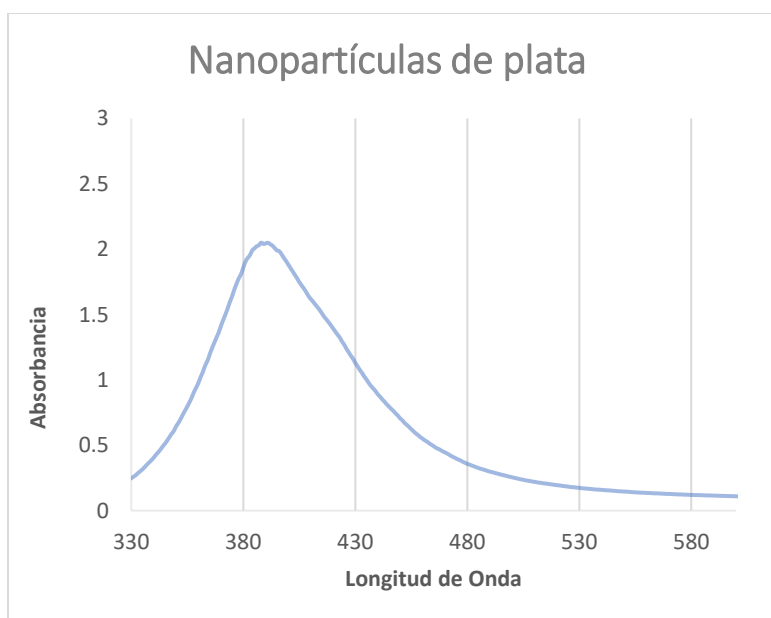
RESULTADOS y DISCUSIÓN

De acuerdo con la técnica de síntesis de AgNP descrita anteriormente, se obtuvo una solución coloidal color amarilla claro (imagen 1) con un pH de 7.2



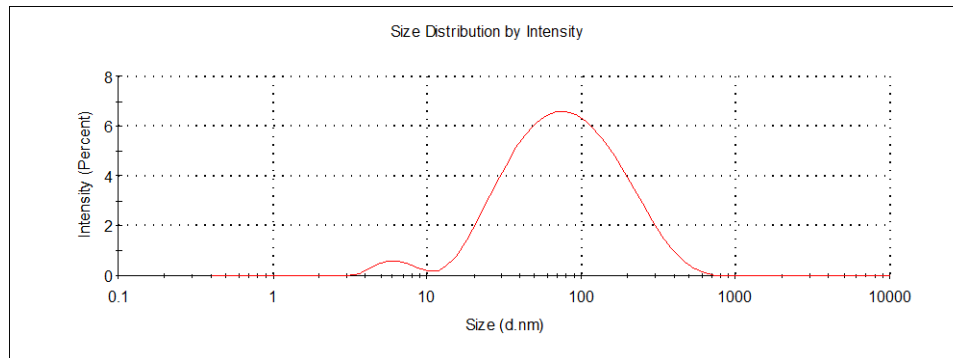
Imagen 1

La caracterización de UV visible nos permite observar un pico único de absorbancia a 400 nm que es representativo de AgNP.(grafica 1)

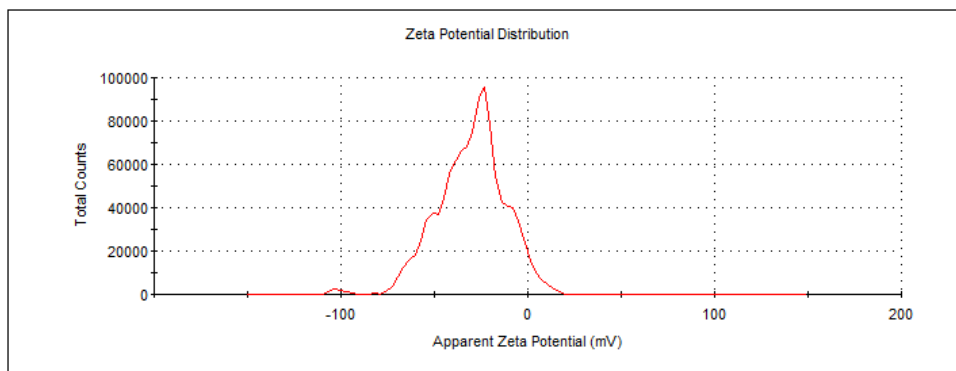


Grafica 1

La prueba de DLS dio como resultado un 90% de AgNP con un tamaño de 80 nm y un 10 % de AgNP con un tamaño de 8nm (grafica 2), y el potencial Z dio como resultado una carga de -29.9(grafica 3, tabla 1), coincidente con la carga de las AgNP.



Grafica 2



Grafica 3

Zeta Potential (mV): -29.9
Zeta Deviation (mV): 17.8
Conductivity (mS/cm): 0.233

Tabla 1

En la caracterización por microscopía electrónica de transmisión podemos observar AgNP esféricas de aproximadamente 80 nm y 10 nm (*imagen2*, *imagen3*)

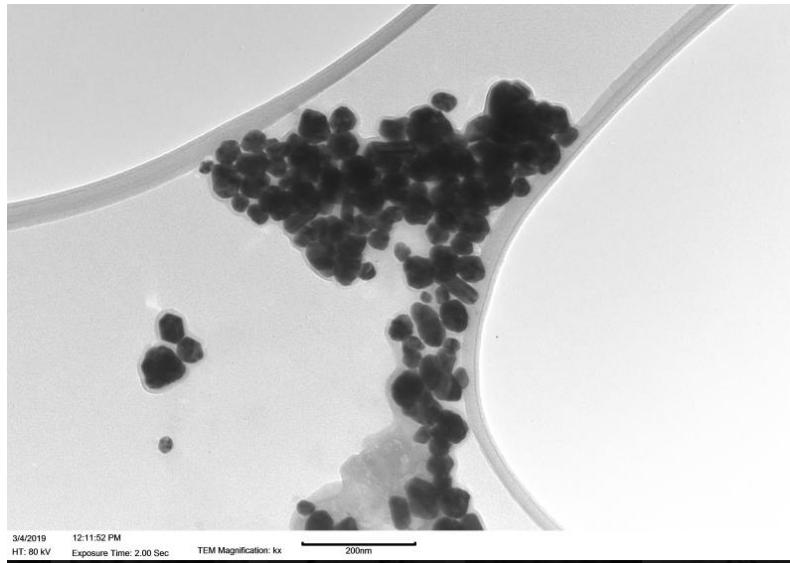


Imagen 2

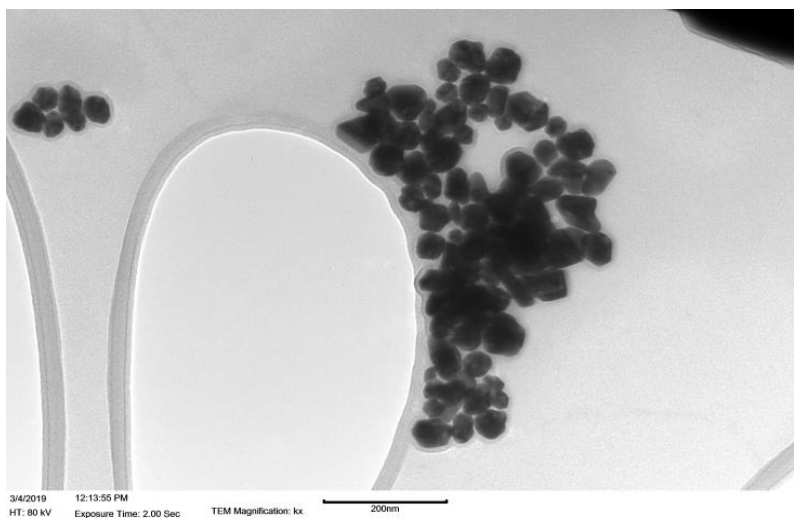
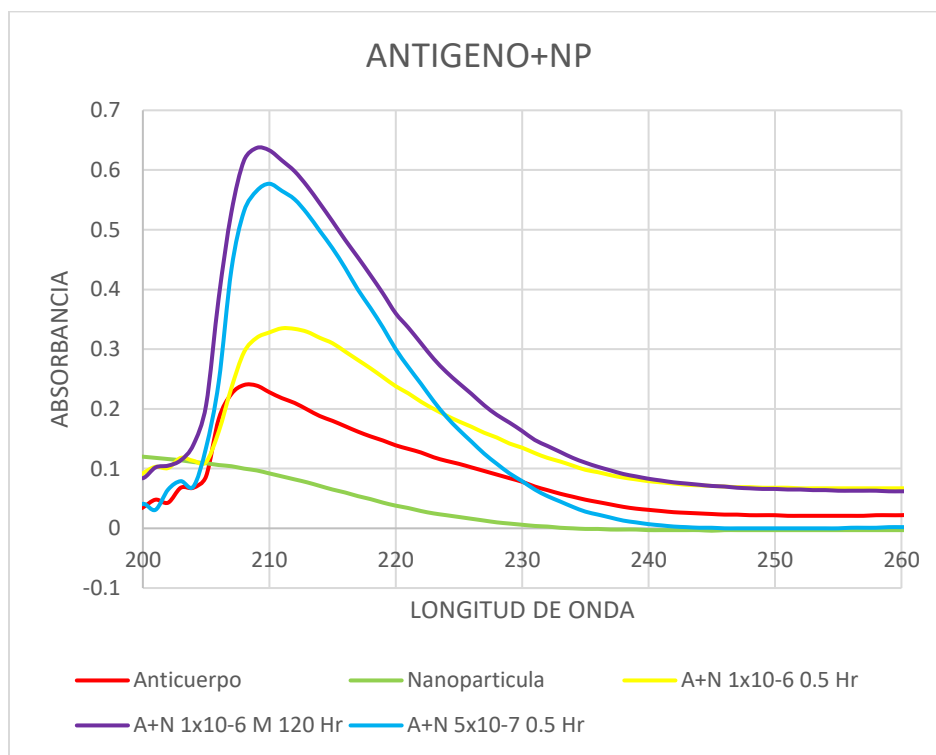


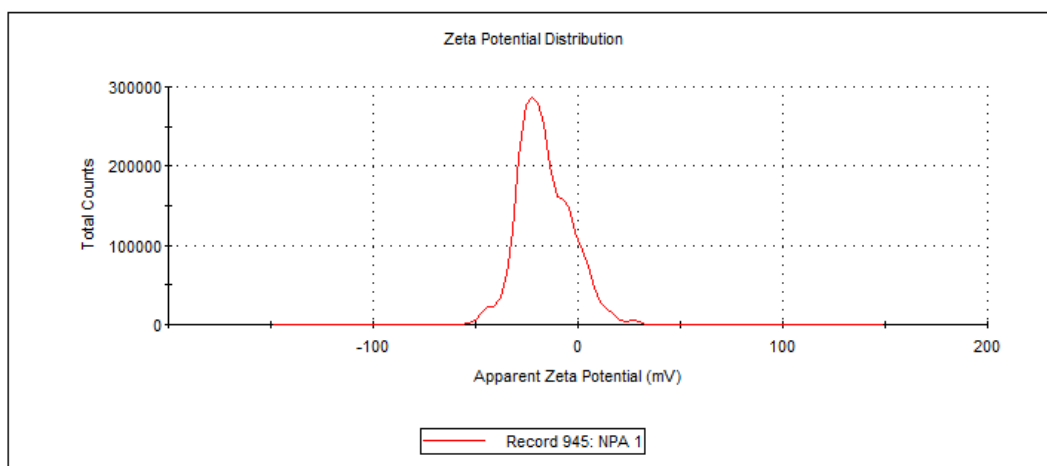
Imagen 3

La unión de la AgNP y el AA se puede explicar, por el aumento de absorbancia a medida que existe más interacción entre los mismos. Se puede observar claramente el aumento exponencial de la absorbancia a 210 nm cuando se usa una concentración de 1×10^{-6} a 30 min y después a 1×10^{-6} durante 120 horas.(grafica 4).además se observa una disminución de la absorbancia a 400nm.



Grafica 4

El potencial Z del complejo AgNP-AA dio como resultado una carga de -16.4 (tabla 2) , la cual difiere de la carga de la AgNP sola (tabla1), esto demuestra que al existir unión entre los compuestos, menos cargas negativas de la AgNP quedan disponibles , además presenta un solo pico , lo que nos explica la lectura de un complejo y no dos compuestos independientes (grafica 5).



Grafica 5

Zeta Potential (mV): -16.4
Zeta Deviation (mV): 12.7
Conductivity (mS/cm): 4.04

Tabla 2

La microcopia electrónica de transmisión nos permite observar varias zonas de antiácido lipoteicoico coronados por AgNP.(imagen 4, imagen 5)

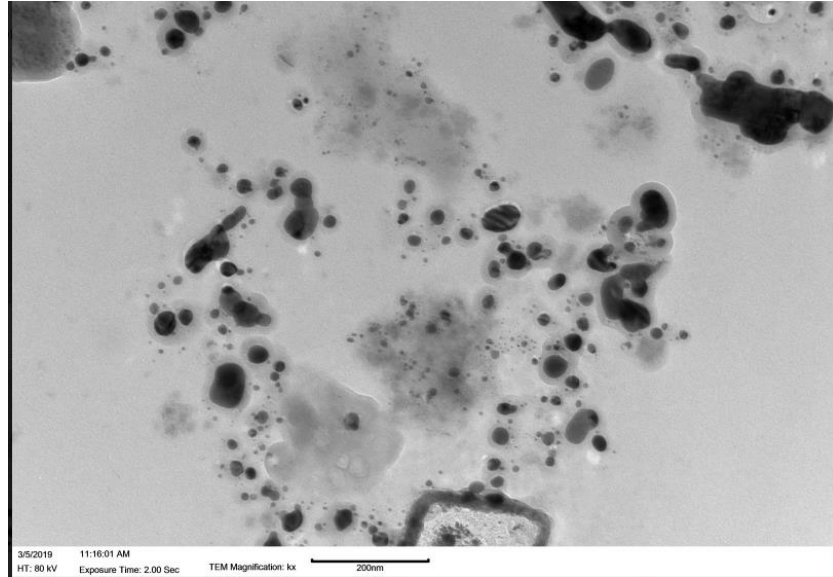


Imagen 4

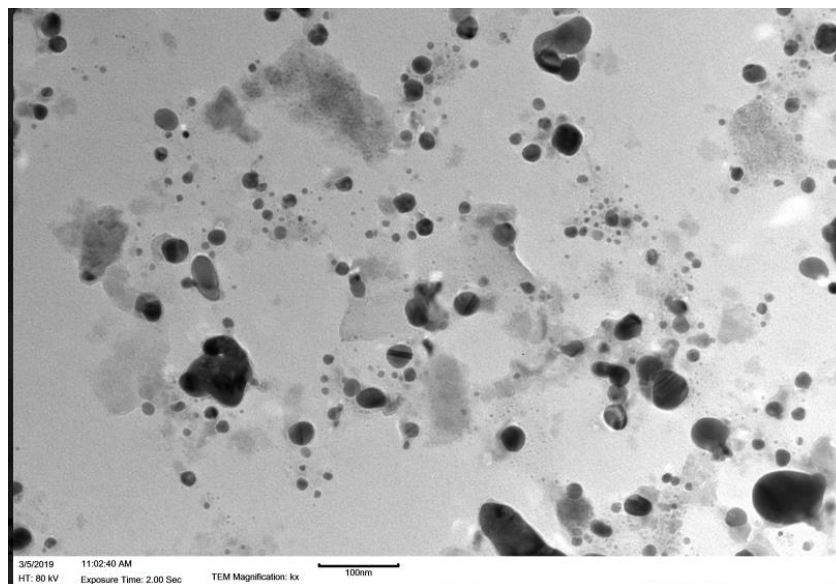
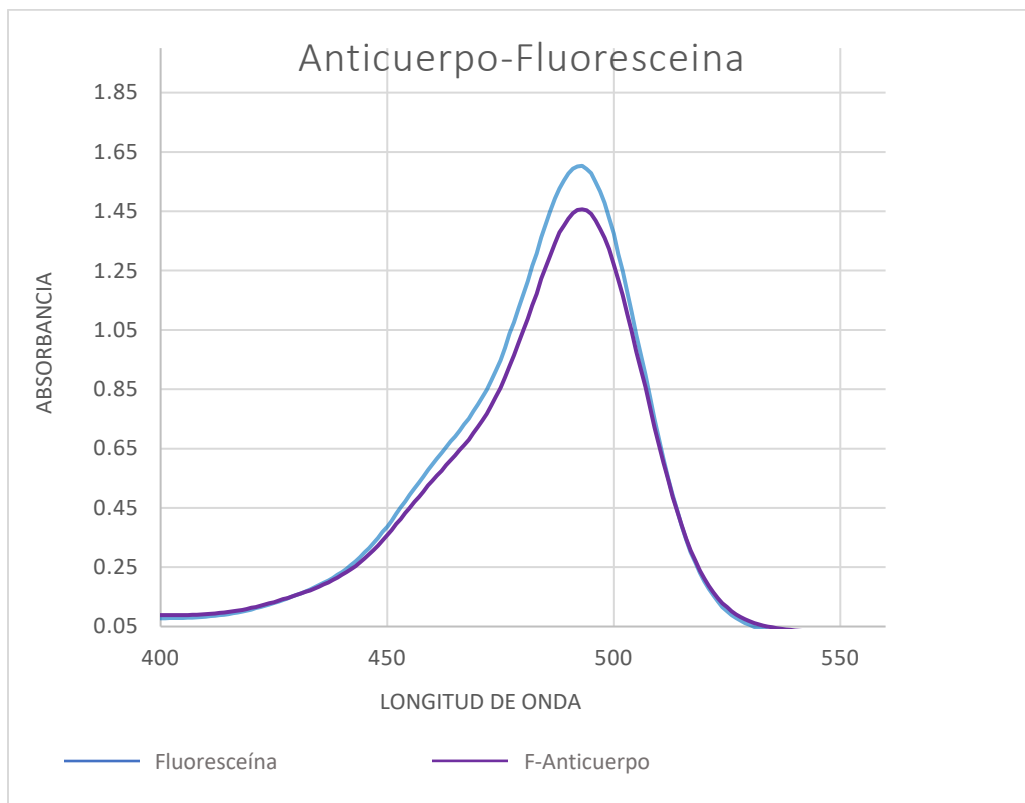
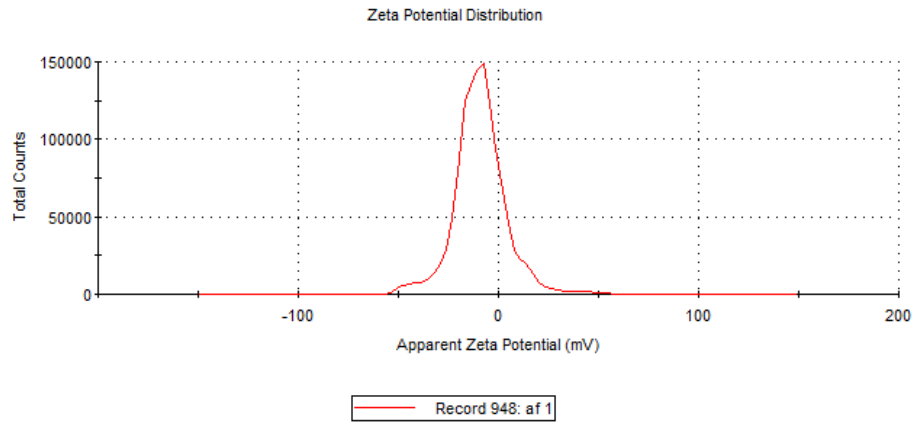


Imagen 5

La disminución de la absorbancia a 500 nm del complejo AA-F se reprodujo como lo describe la literatura, (grafica 6) en el potencial z la carga fue de -9.40 (tabla 3) además la presencia de un solo pico bien definido demuestra la unión del complejo y no dos compuestos independientes. (grafica 7)



Grafica 6

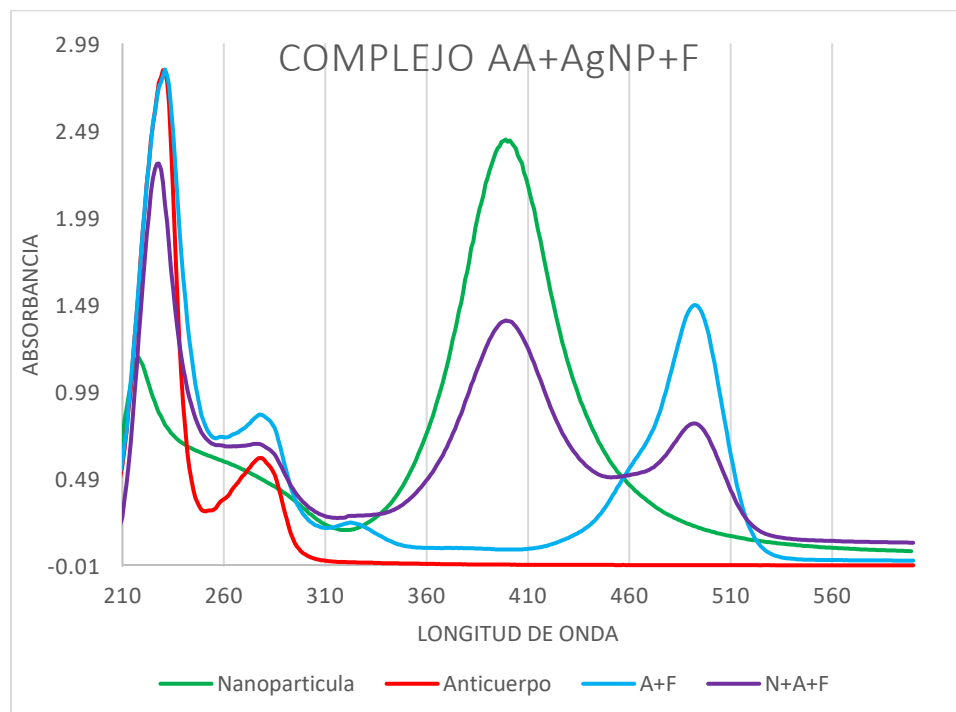


Grafica 7

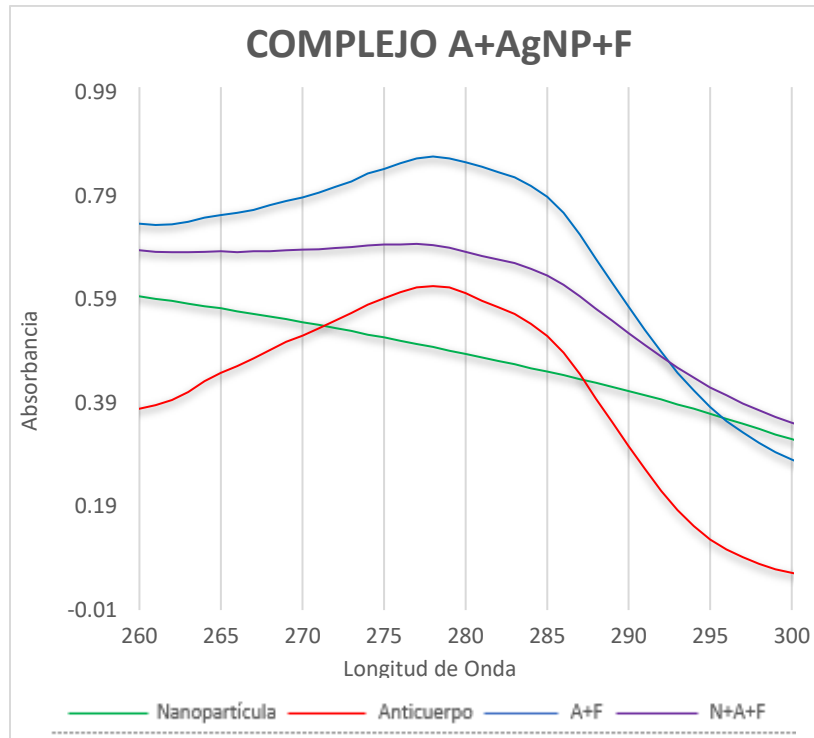
Zeta Potential (mV): -9.40
Zeta Deviation (mV): 11.3
Conductivity (mS/cm): 4.93

Tabla 3

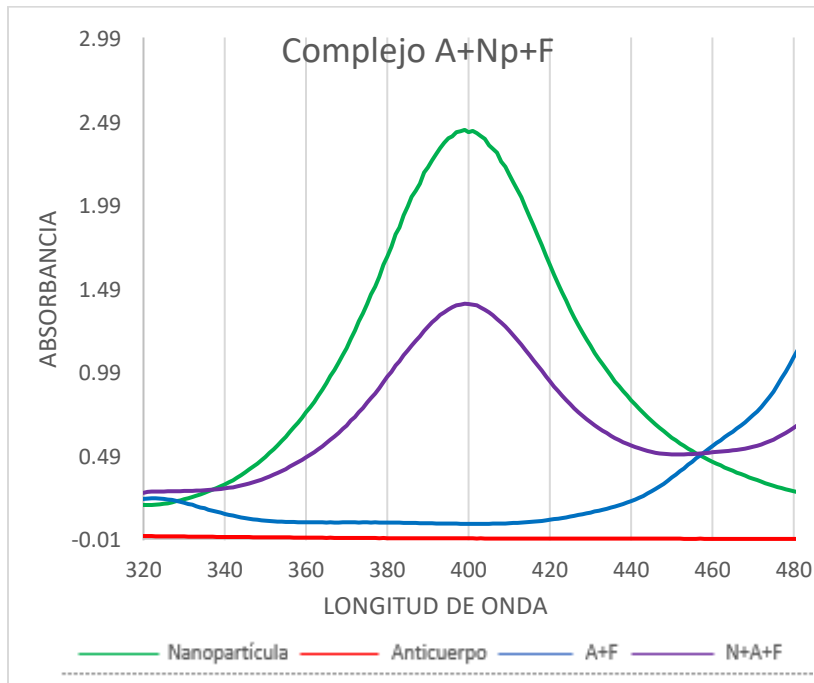
En el UV visible del complejo AgNp-AA-F existen desplazamientos de longitud de onda en tres partes de la gráfica, a 270nm que es el pico del anticuerpo existe un aumento de la absorbancia(grafica 9), a 400 nm en el pico de la AgNP existe una disminución de la absorbancia(grafica 10), y a 500nm en el pico de la fluoresceína también existe una disminución de la absorbancia, todo esto concuerda con las graficas descritas anteriormente, por lo tanto se puede aseverar que existe unión de los tres componentes de este complejo y que no se encuentran en la solución como tres entidades independientes.(grafica 8)



Grafica 8

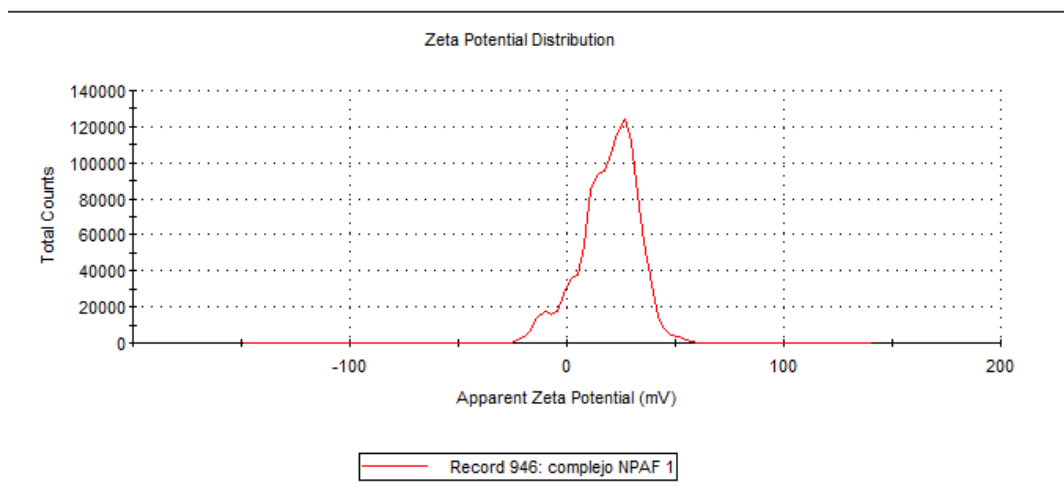


Grafica 9



Grafica 10

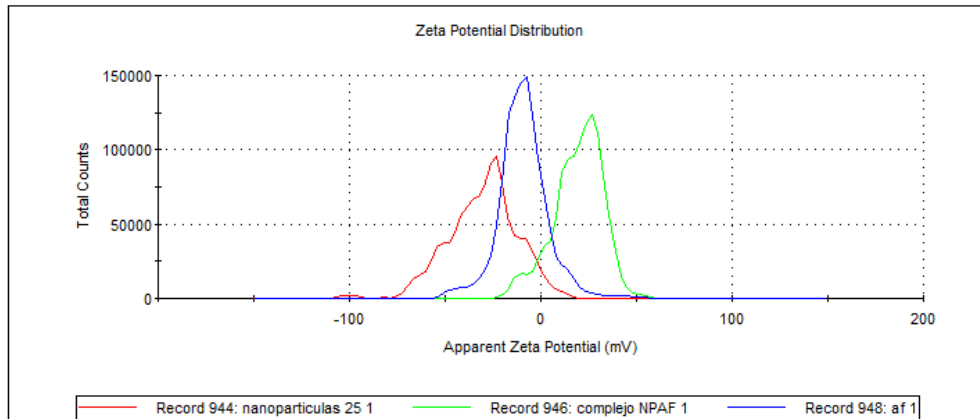
El potencial z del complejo AgNP-AA-F muestra un solo pico con carga positiva de 19.4(tabla 4,grafica 11)), que es completamente diferente a las cargas obtenidas en los experimentos de AgNP y AgNP-AA(grafica 12,tabla 5), lo que demuestra que existe una unión entre los tres componentes, ya que el cambio de carga superficial se da por la interacción de las moléculas que forman el complejo.



Grafica 11

Zeta Potential (mV): 19.4
Zeta Deviation (mV): 12.7
Conductivity (mS/cm): 4.66

Tabla 4



Grafica 12

	Mean (mV)
Zeta Potential (mV): 19.4	Peak 1: 21.5
Zeta Deviation (mV): 12.7	Peak 2: -11.9
Conductivity (mS/cm): 4.66	Peak 3: -12.5

Tabla 5

CONCLUSIONES

Aunque el objetivo de la limpieza y conformación es eliminar las bacterias dentro del SCR, la evaluación del grado de desinfección actualmente no se realiza de forma rutinaria, debido a la falta de un método de identificación bacteriana rápida.

Las técnicas actuales de identificación no permiten determinar la presencia de las bacterias localizadas en conductos accesorios y túbulos dentinarios, pero sigue siendo útil para determinar los niveles bacterianos que son compatibles con el proceso de reparación.

Existe una correlación entre la presencia bacteriana en el momento de la obturación y el éxito del tratamiento de conductos, y se ha demostrado que las bacterias y sus subproductos permanecen los principales agentes etiológicos de las lesiones inflamatorias apicales.

Consideramos que la disponibilidad del biosensor como un kit de prueba de diagnóstico rápido en el consultorio, será útil para que el odontólogo sea capaz de determinar de forma objetiva cuando es el momento ideal para obturar, sin embargo, se deberán realizar más estudios para determinar la eficacia del mismo.

BIBLIOGRAFIA

1. K Hargreaves, L Berman: Cohen's Pathway of the Pulp. 11th edition. St Louis, Vasa. 629-632. 2015
2. S Kakehashi, HR Stanley, RJ Fitzgerald: The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 20:340 1965.
3. JF Siqueira Jr, BH Sen: Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 97:632 2004.
4. L Fabricius, G Dahlén, G Sundqvist, et al.: Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur j oral sci.* 114:278 2006.
5. K Soo Tan, V Soo Hoon, S Yilling, et al.: Rapid method for detection of root canal bacteria in endodontic therapy. *J Endod.* 41:447 2015.
6. C Dobell: Antony van Leeuwenhoek and his "little animals,". Staples Press London 1932.
7. WD Miller: An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos.* 36:505 1894.
8. AJR Möller, L Fabricius, G Dahlén, et al.: Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 89:475 1981.
9. G Sundqvist: Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 7:257 1992.
10. BJ Paster, SK Boches, JL Galvin, et al.: Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 183:3770 2001.
11. PP Bosshard, S Abels, R Zbinden, et al.: Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J Clin Microbiol.* 41:4134 2003.
12. CR Woese: Bacterial evolution. *Microbiol Rev Rev.* 51:221 1987.
13. JF Siqueira Jr, IN Rôças: Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1-current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 31:411 2005.
14. JF Siqueira Jr, IN Rôças: Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2-redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 31:488 2005.
15. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods.* 59:175-183 2003.
16. Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* 60:1-8 2016.
17. A Abbas, A Litchman, S Pillai: Cellular and molecular immunology. 9th edition. Philadelphia, Elsevier Saunders. 89-96. 2018
18. A Turner, G Wilson, I Kaube : Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford, UK: Oxford University Press. 770 1987.

19. A avalcanti , B Shirinzadeh , M Zhang ,LC Kretly : Nanorobot Hardware Architecture for Medical Defense. *Sensors*. 8: 2932–2958 2008.
20. H Cheer. An overview of chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications. *Advances in Photosynthesis and Respiration* 25: 1-26 2006.
21. PC Lee , D Meisel :Adsorption and surface enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J Phys Chem* 86: 3391–95 1982.
22. J Mariam, PM Dongre, DC Kothari: Study of Interaction of Silver Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. *J Flouresc*. 21: 2193-2399 2011.
23. EW Voss, DE Lopatin: Fluorescein. Hapten and Antibody Active-Site Probe *biochemistry*. 10: 208-213 1971.
24. JF Siqueira, FR Alves, BM Almeida, et al.: Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. *J Endod*. 36:1860 2010.
25. U Sjögren, D Figdor, S Persson, et al.: Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 30:297 1997.