

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



TESIS

**“EFECTIVIDAD ANTIBIOFILM DE UN HIDROGEL CARGADO CON
NANOPARTÍCULAS LIPOFILICAS DE BISMUTO SOBRE EL
BIOFILM DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* INTRACONDUCTO”**

POR

C.D. MARCO ANTONIO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA**

NOVIEMBRE, 2018

TESIS
**“EFECTIVIDAD ANTIBIOFILM DE UN HIDROGEL CARGADO CON
NANOPARTÍCULAS LIPOFILICAS DE BISMUTO SOBRE EL BIOFILM
DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* INTRACONDUCTO”**

POR

C.D. MARCO ANTONIO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

Comité de Examen de Tesis

Dr. Jorge Jaime Flores Treviño
Presidente

Dr. Claudio Cabral Romero
Secretario

Dra. Fanny López Martínez
Vocal

TESIS
**“EFECTIVIDAD ANTIBIOFILM DE UN HIDROGEL CARGADO CON
NANOPARTÍCULAS LIPOFILICAS DE BISMUTO SOBRE EL BIOFILM
DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* INTRACONDUCTO”**

Por

C.D. MARCO ANTONIO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

Comité de Tesis

**Dr. Claudio Cabral Romero
Director de Tesis**

**Dr. Jorge Jaime Flores Treviño
Co-Director de Tesis**

**Dr. Rene Hernández Delgadillo
Asesor Metodológico**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a dios por todas las bendiciones recibidas.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

DEDICATORIA

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
ÍNDICE.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3.OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos específicos.....	4
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Caries y enfermedad pulpar.....	5
4.2 Tratamiento endodóntico.....	7
4.3 Irrigantes.....	8
4.3.1 EDTA.....	9
4.4 Retratamiento endodóntico.....	12
4.5 <i>Enterococcus faecalis</i>	12
4.6 Hidróxido de calcio.....	14
4.7 Biofilm.....	14
4.8 Bismuto.....	15
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
5.1 Síntesis de nanopartículas lipófilicas de bismuto BisBAL.....	18
5.2 Caracterización de las nanopartículas BisBAL por SEM.....	18
5.3 Desarrollo de un hidrogel cargado con BisBAL NPs.....	19
5.4 Actividad antimicrobiana del hidrogel-Bisbal NPs	19
5.5 Clonación y expresión de la proteína roja fluorescente por una cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> recombinante	20
5.6 Actividad antibiofilm del gel-BisBAL NPs sobre el biofilm de <i>E. faecalis</i>	21
5.7 Detección de <i>Enterococcus faecalis</i> mediante PCR.....	21
6.RESULTADOS.....	23
6.1 Caracterización de las nanopartículas lipofílicas de bismuto BisBAL.....	23
6.2 Caracterización del hidrogel cargado con BisBAL NPs por SEM.....	24
6.3 Actividad antimicrobiana del hidrogel-Bisbal NPs.....	25
6.4 Transformación de <i>E. faecalis</i> con el plásmido pDsRed2.....	27
6.5 Curva de crecimiento de cepa recombinante y silvestre de <i>E. faecalis</i>	27
6.6 Actividad antibiofilm <i>In Vitro</i> del hidrogel-BisBAL NPs.....	29
6.7 Desprendimiento del biofilm de <i>E. faecalis</i> intraconducto por el Hidrogel-BisBAL NPs.....	30
Biofilm de <i>E. faecalis</i> sobre discos de dentina por SEM.....	34
Tratamiento del biofilm de <i>E. faecalis</i> con BisBAL NPs.....	35
Tratamiento del biofilm de <i>E. faecalis</i> con hipoclorito de sodio.....	35
Tratamiento del biofilm de <i>E. faecalis</i> con hidróxido de calcio.....	36
7. DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIONES.....	39
9. BIBLIOGRAFÍA.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Caracterización de las nanopartículas de bismuto	24
2. Caracterización del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL.....	25
3. Desarrollo de una cepa fluorescente recombinante de <i>E. faecalis</i>	28
4. Actividad a.ntibiofilm del hidrogel-BisBAL NPs	30
5. Desprendimiento del biofilm de <i>E. faecalis</i> intraconducto por el hidrogel-BisBALNPs.....	33
6. Biofilm de <i>E. faecalis</i> sobre discos de dentina por SEM.....	33
7. Tratamiento del biofilm de <i>E. faecalis</i> con BisBAL NPs.....	34
8. Tratamiento del biofilm de <i>E. faecalis</i> con hipoclorito de sodio.....	35
9. Tratamiento del biofilm de <i>E. faecalis</i> con hidróxido de calcio.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico de la metodología empleada.....	17
Tabla 1. Actividad Antimicrobiana del Hidrogel cargado con BisBAL NPs	26
Gráfico de Actividad antibiofilm del Hidrogel con BisBAL NPs sobre el biofilm de <i>E. faecalis</i>	25

RESUMEN

Una de las principales metas del tratamiento endodóntico es eliminar a todos los microorganismos que colonizan la cámara pulpar y conducto radicular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibiofilm de un hidrogel cargado con nanopartículas de bismuto sobre el biofilm de *Enterococcus faecalis* intraconducto. Se obtuvo un biofilm de *E. faecalis* intraconducto de 21 días (3 semanas) *in vitro* y se caracterizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fluorescencia (MF). El biofilm obtenido se expuso al hidrogel con nanopartículas BisBAL 1000 µM, hipoclorito de sodio, hidróxido de calcio o nada durante 10 min., 24 hrs, 48 hrs., 72 hrs. y se observó mediante SEM y MF, cuantificando la viabilidad celular. Dentro de los resultados obtenidos las imágenes de MF muestran que después de 24h de tratamiento con el Gel-BisBAL NPs se removió el 99% del biofilm formado por *E. faecalis*, mientras que el hidróxido de calcio removió solo el 16% y el gel solo sin nanopartículas no tuvo efecto. Las imágenes de MF muestran que después de 24h de tratamiento con el hidrogel-BisBAL NPs se removió el 99% del biofilm formado por *E. faecalis*, mientras que el hidróxido de calcio removió solo el 16% y el gel solo sin nanopartículas no tuvo efecto. Estos resultados fueron muy similares tanto en placas de poliestireno de 96-pozos como en el modelo de biofilm intraconducto. La detección por PCR del DNA bacteriano apoyo los resultados obtenidos previamente corroborando la propiedad antibiofilm del hidrogel-BisBAL NPs, constituyendo una alternativa innovadora para el tratamiento de las infecciones endodónticas.

ABSTRACT

One of main goals of endodontic treatment is to eliminate all microorganisms colonizing pulp chamber and root canal. The objective of this work was to develop a hydrogel loaded with bismuth lipophilic nanoparticles and evaluate its antimicrobial and antibiofilm effectiveness to inhibit and detach the *E. faecalis* biofilm. The antibiofilm activity of BisBAL NPs-Gel was determined by using a Drip Flow Modified Method on root canal to develop an *E. faecalis* biofilm of 21 days of formation, which was characterized by scanning electron and fluorescence microscopies. Additionally the bacterial DNA specific of *E. faecalis* was detected by PCR and electrophoresis by using the DNA extracted from a radicular scraping after the experimental treatment. The obtained results show that after 24h of treatment with 1000 μ M of BisBAL NPs-Gel detached 99% of the bacterial biofilm, reducing the *E. faecalis* biofilm ten times in comparison with calcium hydroxide. (common treatment) when *E. faecalis* DNA was detected by PCR in samples extracted from root canal. These results were identical when 96-well plate was used as in vitro biofilm experiments employing same strain of *E. faecalis*. In summary, here we present evidence for first time of clinical effectiveness of a hydrogel loaded with bismuth lipophilic nanoparticles being much better than traditional treatment (calcium hydroxide) therefore it is an interesting alternative to fight endodontic infections.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones endodónticas constituyen la complicación más común de la caries dental. Estos microorganismos tienen el potencial de adherirse tanto a los tejidos duros como blandos para formar un biofilm. Es probablemente iniciado después de la infección a la cámara pulpar. Los microorganismos que crecen dentro de biofilm poseen la ventaja de resistir al ataque tanto del sistema inmunológico como a los agentes antimicrobianos. Para remover el biofilm endodóntico se emplean irrigaciones con hipoclorito de sodio o clorhexidina. Sin embargo el tiempo de exposición puede ser demasiado corto y no ser efectivo. De manera adicional se utiliza hidróxido de calcio por periodos largos de hasta 15 días, pero su actividad antimicrobiana es muy cuestionada sobre todo contra *E. faecalis*. Es urgente desarrollar nuevas alternativas de tratamiento que remuevan e inactiven el biofilm de *E. faecalis* intraconducto ya que hoy en día el medicamento de elección es el hidróxido de calcio pero estudios revelen que no combate por completo el biofilm antes mencionado. El objetivo de este estudio fue innovar en un hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto ya que este es un elemento de la tabla periódica que presenta actividad antimicrobiana, antimicótica y bactericida sin causar toxicidad sobre células epiteliales humanas. Dentro de los resultados obtenidos las imágenes de MF muestran que después de 24h de tratamiento con el hidrogel cargado con 1000 μM de nanopartículas BisBAL se removió el 99% del biofilm formado por *E. faecalis*, mientras que el hidróxido de calcio removió solo el 16% y el gel solo sin nanopartículas no tuvo efecto. Estos resultados fueron muy similares tanto en placas de poliestireno de 96-pozos como en el modelo de

biofilm intraconducto. La detección por PCR del DNA bacteriano apoyo los resultados obtenidos previamente corroborando la propiedad antibiofilm del Gel-BisBAL NPs. En resumen se presenta evidencia por primera vez acerca de la eficacia antibiofilm intraconducto de un hidrogel cuyo principio activo son nanopartículas lipofílicas de bismuto y supero con claridad al tratamiento comercial actual por lo que constituye una alternativa innovadora para el tratamiento de las infecciones endodónticas. No se propone sustituir a la irrigación con hipoclorito de sodio, sino más bien reemplazar el tratamiento con hidróxido de calcio por el hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto por 7 días. Al ser un gel de agua no se tendría que retirar y al disolverse solo no causaría ningún efecto secundario sobre tejido pulpar o dentinario.

2. HIPÓTESIS

La efectividad antibiofilm del hidrogel cargado con nanopartículas de bismuto será mejor que el hidróxido de calcio para remover el biofilm de *Enterococcus faecalis* intraconducto.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estudiar la efectividad antibiofilm de un hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto sobre el biofilm de *Enterococcus faecalis* intraconducto.

3.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto y evaluar su estabilidad a diferentes tiempos de almacenamiento.
- Obtener un biofilm de *Enterococcus faecalis* intraconducto de 21 días de formación sobre molares uniradiculares.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con 1000 μM de nanopartículas lipofílicas de bismuto contra patógenos orales.
- Determinar la actividad antibiofilm del hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto en un modelo de biofilm intraconducto de *Enterococcus faecalis*.

4. ANTECEDENTES

4.1 Caries y enfermedad pulpar

La caries dental es una enfermedad oral, de alta prevalencia (Kalesinskas et al, 2014); es considerada una pandemia mundial (Peterson et al, 2014) a pesar de las actividades de prevención (Díaz-González, 2010); es un problema grave de salud pública (Suga et al, 2014), de origen multifactorial (Ingle et al, 2014). Es una enfermedad crónica infectocontagiosa acumulativa (Medina-Solís et al, 2007). Por su alta morbilidad se encuentra entre las cinco enfermedades de mayor demanda de atención en los servicios de salud del país (NOM-013-SSA2-1994). Existe una relación entre el nivel socio-económico de la población y su atención dental (Qiu, et al, 2014).

El odontólogo se enfrenta rutinariamente con dolores agudos, siendo el dolor pulpar el que más lleva a los pacientes a consulta de urgencia (Gaviria et al, 2012), donde el odontólogo debe decidir si salvar o sacrificar la pulpa dental (Ricucci et al, 2014). La pulpa es el órgano que provee al diente de vitalidad mediante componentes vasculares y nerviosos, y mantiene su fisiología normal. También se encarga de la dentinogénesis, proceso dinámico que ocurre tanto en etapas de maduración como ante la reacción a injurias o estímulos, ya sean traumáticos o infecciosos como la caries (Bruno et al., 2010).

Es una prioridad mantener la vitalidad dental (Mamaladze y Ustiashvili, 2010). Sin embargo, la presencia de microorganismos causa la enfermedad pulpar (Baumotte et al, 2011), hongos, y virus contribuyen a la microbiota de infecciones endodónticas, sin embargo, las bacterias son más comunes en estas infecciones (Rodríguez y Oporto, 2014). El patógeno responsable de la caries dental es *Streptococcus mutans*, (Nomura et al, 2014), en cambio *Enterococcus faecalis* es encontrado frecuentemente en el canal radicular (Bailón et al, 2014).

Cualquier plan terapéutico tiene como objetivo eliminar y controlar las causas de la afección, los signos y síntomas (Moreno et al, 2011). El objetivo de la endodoncia es eliminar bacterias presentes en los conductos radiculares infectados (Bailón et al, 2014) y aportar un buen sellado (Kawashina et al, 2009). La infección endodóntica se desarrolla en los conductos radiculares en ausencia de las defensas del huésped, como consecuencia de la necrosis de la pulpa o por la eliminación de la pulpa por tratamiento (Siqueira y Rocas, 2011). Las principales vías de entrada de los microorganismos a la cavidad pulpar comprenden principalmente túbulos dentinarios expuestos (caries), cavidad abierta (desalojo de material de obturación), conductos laterales a través de enfermedad periodontal, falta de restauración, entre otros (Lakshmi et al, 2010). La desinfección eficaz de todo el conducto radicular, se logra en la preparación biomecánica, proceso durante el cual se elimina toda causa de infección (Gaspar et al, 2013).

4.2 Tratamiento endodóntico

El objetivo final de la terapia endodóntica es regresar la salud a una pieza dental y así, seguir conservándola funcional en boca (Saini et al, 2013). Un paso decisivo en endodoncia es la conformación mecánica y la limpieza química de conductos radiculares; con el objetivo de eliminar todos los restos de tejido del espacio radicular; así como la eliminación de capas de dentina infectada de los conductos y un buen sellado (Pawar et al, 2014).

Limpiar y desinfectar el canal radicular es la principal meta a obtener en un tratamiento de conductos (Guidotti et al, 2014). El uso de un irrigante apropiado es esencial durante el tratamiento de endodoncia (Giardino et al., 2014). Es de suma importancia que el irrigante cumpla con la remoción de tejido, barrillo dentinario y elimine microorganismos y biofilm (Haapasalo et al, 2014). Recientemente se han introducido diversas técnicas con el objetivo principal de mejorar la desinfección del conducto radicular en las zonas inaccesibles (Mathew et al, 2014).

Como se menciona anteriormente, el éxito de una endodoncia depende de la eficacia en su conformación y la limpieza brindada al conducto radicular. Una adecuada conformación y limpieza está dada principalmente por una instrumentación químico-mecánica. La presencia del barrillo dentinario fue confirmada por primera vez por McComb y Smith. Se denomina barrillo dentinario a la capa irregular amorfa que contiene restos de dentina inorgánica y material

orgánico, como el tejido de la pulpa, dentina de reparación, restos necróticos y microorganismos. Se produce durante la instrumentación mecánica de un tratamiento de conductos y se aloja en las paredes del conducto radicular (Khalighinejad et al, 2013).

La capa de barrillo dentinario se adhiere a la superficie dentinal del conducto radicular y ocluye a los tubulillos; por lo que esta capa desfavorece la penetración de las soluciones irrigantes y disminuye el índice de éxito de la obturación debe eliminarse (Prado et al, 2011). La capa de barrillo dentinario bloquea las paredes del canal instrumentado y puede servir como un reservorio de irritantes microbianos (Ahmetoglu et al, 2014).

El irrigante (o la combinación de irrigantes) ideal elimina las bacterias, disuelve el tejido necrótico, lubrica el conducto, elimina la capa de barrillo dentinario y no irrita los tejidos. A continuación se detallarán dos de las soluciones más frecuentemente utilizadas en endodoncia; principalmente el Hipoclorito de Sodio NaOCl y el EDTA; así como también se dará un panorama del citrato de sodio.

4.3 Irrigantes

- AGENTES QUELANTES

Los agentes quelantes fueron introducidos en endodoncia en 1957 por el Dr. Nygaard-Ostby.

MTAD

Biopure (DENTSPLY) también conocido como MTAD (mezcla de tetraciclina, ácido y detergente) es una solución irrigante que contiene doxiciclina, ácido cítrico y un detergente. Constantemente se desarrollan productos químicos y sus combinaciones basadas en antibióticos. Sin embargo no logra destruir la biopelícula. El ácido cítrico del MTAD elimina eficazmente el barrillo dentinario, BioPure MTAD fue más agresivo en la erosión de la dentina que el EDTA, fue necesario añadir NaOCl para disolver la materia orgánica (Metzger et al, 2011).

4.3.1 Ácido etilendiaminote tracético (EDTA)

El EDTA comenzó a usarse en endodoncia durante 1957 por Nygaard-Ostby, los quelantes como el EDTA crean un complejo de calcio estable con el barrillo dentinario, la capa de detritos y los depósitos cálcicos a lo largo de las paredes de los conductos. Ayuda a prevenir el bloqueo apical, contribuye a la desinfección, mejora la difusión de las soluciones al eliminar la capa de barrillo dentinario (Metzger et al, 2011). El EDTA es generalmente aceptado como el agente quelante más eficaz con propiedades lubricantes prominentes y se utiliza ampliamente en la terapia endodóntica (Darda et al, 2014). La capa de barrillo dentinario bloquea las paredes del canal instrumentado y puede servir como un reservorio de irritantes microbianos (Ahmetoglu et al, 2014). El EDTA al 17% mostró un grado más alto de descalcificación de las superficies de dentina que el EDTA en gel.

El efecto de los quelantes sobre los conductos calcificados, tortuosos y estrechos para establecer la permeabilidad depende de la amplitud del conducto y de la cantidad de sustancia activa disponible cuando continúa el proceso de desmineralización hasta que todas las moléculas del quelante han formado complejos de calcio. El EDTA pierde eficacia en un medio ácido, así que se cree que la acción del EDTA es autolimitada. Se demostró que el efecto antibacteriano del EDTA era más fuerte que el del ácido cítrico y el del NaOCl al 0.5%, pero más débil que el del NaOCl al 2.5% y el de la CHX al 0.2% y mucho mejor que el de la solución salina. El EDTA ejerce su máximo efecto cuando se usa de forma sinérgica con el NaOCl. El cloro, la sustancia activa del NaOCl es inactivada por el EDTA (Metzger et al, 2011).

El EDTA debe de utilizarse como irrigante final del procedimiento para eliminar el barrillo dentinario. Se encuentra disponible en gel, líquido y pasta; y sus concentraciones varían entre el 15-17% a veces se le puede añadir detergente para disminuir la tensión superficial, aumentar su capacidad limpiadora y potenciar su acción bactericida; se pensó en una solución líquida de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para suavizar la dentina del conducto radicular, que fuera químicamente capaz de disolver el barrillo dentinario, así como para aumentar la permeabilidad de la dentina. Aunque la eficacia del EDTA en el ablandamiento de dentina se ha debatido, las soluciones quelantes han adquirido popularidad. Casi todos los fabricantes de instrumentos de níquel-titanio recomiendan el uso como un lubricante durante la preparación del canal con

instrumentos rotatorios. Además, se recomienda una irrigación final con EDTA del 15-17% para disolver el barrillo en muchos libros de texto (Hülsmann et al, 2003).

Silva et al, 2013 buscaron una solución quelante menos irritante con los tejidos periapicales y más biocompatible que el EDTA. También consideraron razones ambientales para otra alternativa, ya que los niveles de EDTA en el agua de ríos y lagos cada vez se incrementan y éste no es originalmente encontrado en la naturaleza, así que puede considerarse como un contaminante ambiental (Spanó et al, 2009). Muchos ácidos débiles se han evaluado, tal como el ácido cítrico y el vinagre de manzana (Haznedaroğlu, 2003).

El ácido cítrico reacciona rápidamente, secuestrando los iones de calcio y tiene relativamente muy baja toxicidad (Papagianni, 2007) y es bien conocido por poseer actividades antimicrobianas (Yamaguchi et al, 1996).

La irrigación es una parte indispensable del tratamiento de conductos para asegurar su desinfección. Las propiedades de desinfección y disolución de tejidos que posee el NaOCl lo hace el irrigante ideal en la actualidad. Se debe de considerar el uso del EDTA al final del procedimiento para eliminar el barrillo dentinario, seguido por alguna solución inerte (Metzger et al, 2011).

Silva et al, 2013 probaron al quitosán, como nueva alternativa, se sabe que éste es agente quelante utilizado en la industria metalúrgica y que es un polisacárido que ha adquirido en los últimos años renombre en la odontología, ya que posee mucha biocompatibilidad.

4.4 Retratamiento endodóntico

La repetición del tratamiento es un procedimiento para extraer material de obturación del conducto radicular del diente, seguido de la limpieza, conformación y sellado de los canales. Eficacia de diferentes métodos para eliminar conducto de raíz material de relleno en retratamiento - Un estudio in vitro

(Swetha Kasam et al, 2016)

4.5 *Enterococcus faecalis*

Especies de enterococcus, en particular *enterococcus faecalis*, se han encontrado para ser asociado con periodontitis crónica y fallo los tratamientos del conducto de la raíz que implican periodontitis apical crónica. Además, en un estudio de 36 pacientes, *E. faecalis* es comúnmente aislado de las lesiones periapicales en los fracasos al tratamiento endodóntico.

(Qian Wang et al, 2012.)

Ffracasos endodónticos se asocian con una alta proporción de microorganismos aerobios y facultativos gram-positivas. *Enterococcus faecalis*, se pueden encontrar en los conductos radiculares tratados y no tratados, está muy asociado con los fracasos y fallas en el tratamiento de endodocnia. *Pseudomonas*, *estafilococos* y los *estreptococos* son también causantes de fallas.(Christian Tennert et al, 2014.)

Enterococcus faecalis y *Enterococcus faecium* pertenecen a bacterias Gram-positivas que normalmente habitan en el tracto intestinal, cavidad oral y tracto vaginal de seres humanos o animales. *E. faecalis* y *E. faecium* son patógenos oportunistas. En un individuo sano, las dos bacterias no tienen ningún efecto adverso sobre el huésped; Sin embargo, la bacteria puede causar infecciones potencialmente mortales en pacientes inmunocomprometidos. Aunque *E. faecalis* se utiliza como un motor de arranque para la alimentación y probióticos fermentada, la bacteria puede causar endocarditis y bacteriemia, infecciones del tracto urinario, meningitis y otras infecciones en seres humanos. Además, *Enterococcus* se ha encontrado asociado con la infección del pie diabético y el fracaso del tratamiento del conducto radicular. Varios factores de virulencia se han pensado para contribuir a las infecciones de *E. faecalis* Los enterococos pueden sobrevivir en ambientes muy rigurosos, como el pH extremo alcalino (9.6) y concentraciones de sal. Los enterococos pueden resistir detergentes biliares sal, metales pesados, etanol, azida, y la desecación, y puede crecer a 10 ° C a 45 ° C y sobrevivir a 60 ° C durante 30 min. La infección nosocomial causada por *E. faecalis* o *E. faecium* se está convirtiendo en una preocupación importante en los hospitales porque la adquisición de virulencia o resistencia a los antibióticos hace que esta bacteria sea más difícil de controlar. Hasta la fecha, incluso la llamada "línea de defensa última" de la vancomicina no tiene ningún efecto inhibitor sobre algunas cepas resistentes a la vancomicina de *E. faecalis* y *E. faecium*. Por lo tanto, la búsqueda de un agente alternativo o una estrategia para el tratamiento de *E.*

faecalis resistentes a los antibióticos o la infección por *E. faecium* se ha vuelto cada vez más indispensable. (Wenhui Zhang et al, 2013).

4.6 Hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio (CaOH) es el medicamento intracanal más comúnmente utilizado en endodoncia. Se disocia en iones de calcio e hidroxilo en una solución acuosa. La propiedad antimicrobiana de CH se atribuye a la liberación de iones hidroxilo y proporciona un ambiente altamente alcalino con un valor de pH de aproximadamente 12,5 . La mayor parte de los microorganismos en los conductos radiculares infectados son incapaces de sobrevivir en el ambiente alcalino . Sin embargo, CaOH no es igualmente eficaz contra todas las bacterias que se encuentran en el conducto radicular. (Masoud Saatchi et al, 2014.)

4.7 Biofilm

Las bacterias y los hongos pueden formar biofilms para aumentar significativamente su resistencia a los agentes antimicrobianos en comparación con las células planctónicas (Nickel et al., 1985). Los biofilms pueden formarse en todo tipo de superficies e interfaces, incluyendo el cuerpo humano (Costerton et al., 1999). Un biofilm muy común en humanos es la placa dental en cavidad oral, iniciada por *Streptococcus* spp. Incluyendo *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, siendo *S. mutans* el principal agente etiológico de la caries dental en todo el mundo (Jenkinson, 1994).

S. mutans también ha sido identificado en casos de endocarditis donde colonizan endocardio y válvulas cardíacas, probablemente debido a su capacidad para adherirse a las superficies sólidas y formar biofilms (Guntheroth, 1984). Además, se han producido varios informes sobre la aparición de cepas multirresistentes de *Candida* spp., Lo que sugiere que el desarrollo de la resistencia no es un fenómeno exclusivo de las bacterias (Marchaim et al., 2012; Sobel y Vazquez 1996).

4.8 Bismuto

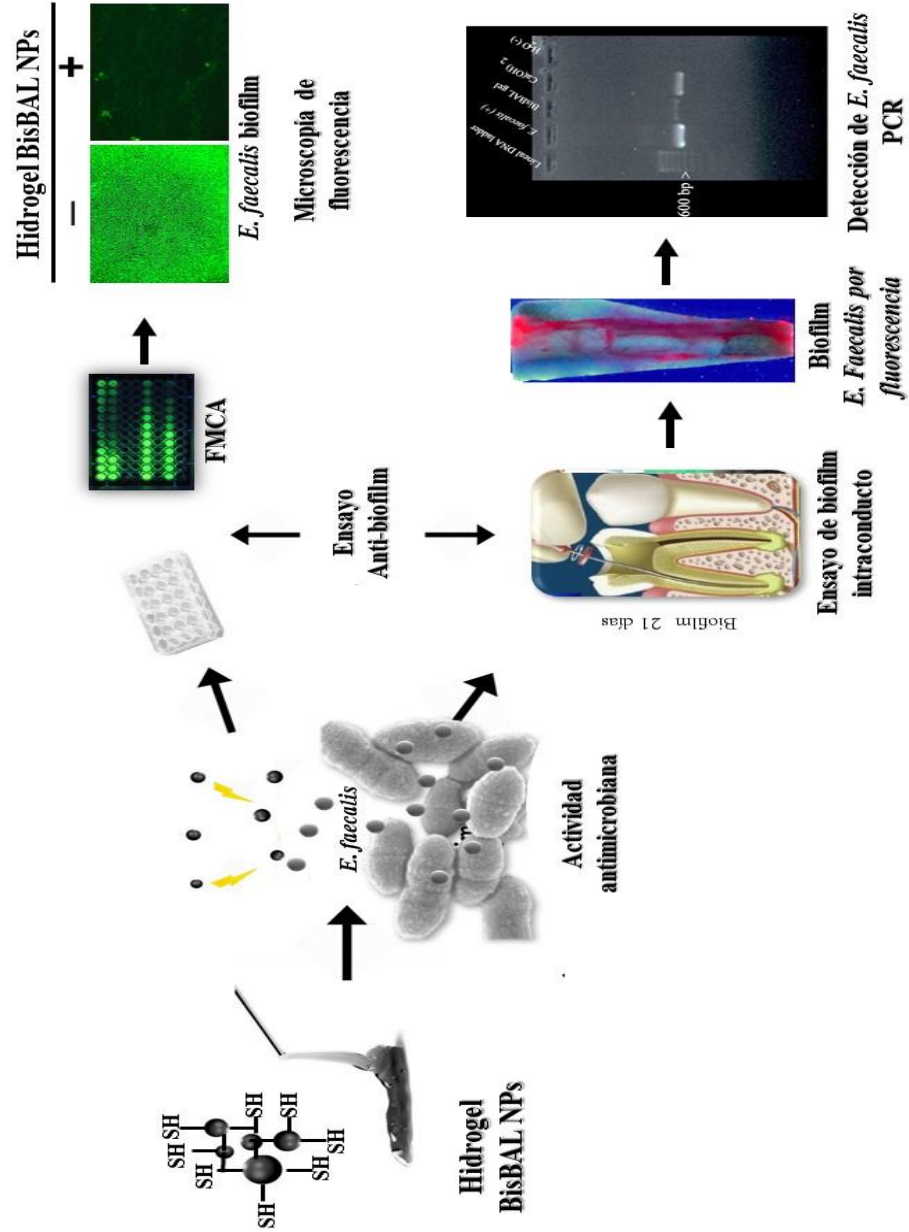
El bismuto elemental y sus compuestos son no carcinógenos y menos bioacumulables y citotóxicos que otros metales pesados, incluyendo antimonio y plomo (Norman 1998; Badireddy y Chellam 2014). Dado que el bismuto elemental tiene una solubilidad en agua muy baja, se puede quelar con compuestos que contienen grupos hidroxilo y sulfhidrilo para producir complejos solubles en agua y biocompatibles que se emplean en productos farmacéuticos y de cuidado personal (por ejemplo Pepto Bismol, De-Nol y Tirtec Pylorid), catalizadores, aleaciones y pigmentos Hongzhe 2011, Yang y Sun 2007, Domenico et al., 1997). Sin embargo, la actividad a largo plazo de los quelatos de bismuto solubles está limitada por su disponibilidad a largo plazo puesto que se consume fácilmente durante el tratamiento. Sin embargo, el bismuto podría ser liberado lentamente de su forma de nanopartículas aprovechando la proporción intrínsecamente alta de área superficial a volumen, induciendo así actividad antimicrobiana in situ persistente

durante largos períodos de tiempo. Las nanopartículas inorgánicas de bismuto superan a los antibióticos comercialmente disponibles como la clorexidina, la nistatina y la terbinafina para controlar el crecimiento y la formación de biofilms por *S. mutans* y *C. albicans* (Hernández-Delgadillo et al., 2012).

Además, las nanopartículas de bismuto con funcionalidad lipófila (por ejemplo, dimercaptopropanol, BAL) inhiben rápidamente las biofilmas de *Pseudomonas aeruginosa* (Badireddy y Chellam 2014, Badireddy et al., 2013).

A diferencia del bismuto, los efectos antimicrobianos y anti-biofilm de las formas iónicas y nanopartículas de plata y cobre han sido ampliamente explorados, no todos los cuales reportan resultados favorables, p. (Dos Santos et al., 2012, McCormack et al., 2007, SilvestryRodriguez et al., 2008, Grass et al., 2011, Kalaycı y otros, 2010, Hazer et al., 2012). Por el contrario, las nanopartículas lipófilas BisBAL parecen ser agentes antimicrobianos más eficaces con MIC más bajos que los iones de plata o nanopartículas de plata (Badankey et al., 2013; Dankovich y Gray, 2011).

5. MATERIAL Y MÉTODOS



Resumen gráfico de la metodología empleada.

5.1 Síntesis de las nanopartículas de bismuto

Las nanopartículas de bismuto fueron sintetizadas utilizando un método coloidal descrito previamente en publicaciones de nuestro grupo[14, 15], brevemente los siguientes reactivos químicos fueron empleados: bismuto pentahidratado ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 2,3-dimercapto-1-propanol (fracción BAL), borohidruro de sodio (NaBH_4), y propilenglicol fueron todos grado analítico y adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Agua ultra pura (Barnstead Nanopure Diamond) fue utilizada para preparar las soluciones y diluciones. Primero una solución stock en rango 2:1 de bismuto (Fracción Bis) y 2,3-dimercapto-1-propanol (Fracción BAL) sirvió como precursor catiónico de las nanopartículas BisBAL. A continuación durante la reducción del precursor con NaBH_4 el color rosa de la solución se transformó en una solución turbia de color negro compuesta por las nanopartículas BisBAL. El stock final estaba compuesto por nanopartículas BisBAL a una concentración final de 50 mM en viales de 10 ml y fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

5.2 Caracterización de las nanopartículas BisBAL

El tamaño y forma de las nanopartículas fue obtenido mediante microscopía electrónica de barrido (SEM; FEI Tecnai G2 Twin, Hillsboro, OR; 160 kV accelerating voltage). La composición elemental de una zona seleccionada permitió la identificación de bismuto mediante la obtención del espectro EDS. La obtención del patrón de difracción de rayos X nos permitió identificar al bismuto mediante difractómetro de rayos X (Panalytical Empyrean, UK). El espectro de absorbancia de la suspensión de nanopartículas fue adquirida mediante el

espectrofotómetro UV-Visible (SpectraMax Plus384 Absorbance Microplate Reader, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA). Finalmente la lipofilicidad de las BisBAL fue evaluada como previamente fue descrito[14] basados en la afinidad de las nanopartículas por el 1-octanol incubados por 30 minutos. La absorbancia de la suspensión de nanopartículas fue determinada a 330 nm.

5.3 Desarrollo del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL

Para obtener el hidrogel cargado con las nanopartículas BisBAL; 50 mL de agua destilada estéril fue calentada a 70°C y lentamente se adicionaron 0.5g de carbopol (Sigma Aldrich, MO, USA) y fueron mezclados mediante agitación magnética. Luego se agregaron 2 mL de la solución de nanopartículas BisBAL para obtener una concentración final de 1000 µM y se continuó mezclando por agitación magnética. A continuación se agregaron 500 µL de trietanolamina (TEA; Sigma Aldrich, MO, USA) y empleando más agua estéril se aforo a 100 mL de volumen final de la solución. Bajo estas condiciones experimentales el hidrogel final posee una concentración final de 1000 µM de nanopartículas BisBAL y se almaceno a 4°C durante 3 meses para evaluar su estabilidad.

5.4 Actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con BisBAL NPs

El efecto bactericida del gel-BisBAL NPs sobre el crecimiento de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* (ATCC; 33478, 10558, 25175, BAA-308, 33592, 11420, y 11775) fue determinado mediante el método de difusión en disco[16]. Las bacterias fueron cultivadas en

medio de cultivo de agar Tripticaseína de soya (TSB, BD DIFCO, Sparks MD, USA) a 37°C, overnight y en condiciones aeróbicas con inóculos estándar (0.5 MacFarland). 100 µL del cultivo bacteriano fue plateado sobre placas de agar TSB utilizando un hisopo estéril. A continuación se generaron pozos en la placa de agar de 5mm de diámetro con aros de poliestireno previamente esterilizados y se agregó el gel-BisBAL NPS en dichos pozos, gel solo sin BisBAL NPs o Hidróxido de calcio como control positivo. Después de incubar durante 18h a 37°C el diámetro del halo de inhibición fue medido mediante el empleo de un Vernier.

5.5 Clonación y expresión de la proteína roja fluorescente por una cepa de *Enterococcus faecalis* recombinante

La proteína roja fluorescente fue expresada de manera permanente y estable por *Enterococcus faecalis* que se transformó con el plásmido vector pDsRed2 (Clontech Laboratories, CA, USA)[17]. La secuencia codificante de la proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.* fue insertada bajo la iniciación lacZ siendo su transcripción controlada por el promotor lac. 1×10^5 células de *E. faecalis* fueron transformadas con 10ng del DNA plasmídico pDsRED2 mediante el método de choque térmico. Las bacterias transformadas fueron cultivadas en medio selectivo (TSB suplementado con 50 µg/mL de ampicilina). A partir de las colonias presentes a las 24 h de crecimiento en el medio selectivo se seleccionaron colonias individuales y se inoculo 5 mL de medio selectivo líquido y se incubo por 24 h a 37 °C. Se extrajo el DNA plasmídico mediante lisis química y el DNA plasmídico obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Las clonas identificadas con el plásmido pDsRed2 fueron

almacenadas a -80°C. La expresión de la proteína roja fluorescente por la bacteria recombinante (pDsRed-*E. faecalis*) fue analizada mediante microscopía de fluorescencia después de crecer 24 h en el medio selectivo.

5.6 Actividad antibiofilm del hidrogel-BisBAL NPs sobre el biofilm de *E. faecalis*

Para evaluar la capacidad del gel-BisBAL NPs para remover el biofilm formado por *E. faecalis*, se emplearon dos estrategias: 1) se hizo crecer pDsRed2-*E. faecalis* en placas de poliestireno de 96 pozos durante 24 h y luego se agregó el gel-BisBAL NPs, gel solo, o bien hidróxido de calcio como control positivo. Se dejó actuar por 24 h más y posteriormente se analizó el biofilm remanente. 2) la segunda estrategia involucro la formación del biofilm de *E. faecalis* intraconducto mediante un sistema de flujo continuo durante 10 días y posteriormente se agregó el mismo esquema de tratamiento por 24 h y finalmente se analizó nuevamente mediante microscopía de fluorescencia a 583 nm empleando software axio visión (Thornwood, NY) y detección del DNA de *E. faecalis* mediante PCR.

5.7 Detección de *Enterococcus faecalis* mediante PCR

Empleando el DNA extraído y purificado del raspado del conducto radicular (biofilm de 10 días mediante el flujo continuo) se amplificó el DNA por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para *E. faecalis* (subunidad 16S). La reacción fue desarrollada en un volumen final de 20µl conteniendo: 2µl de buffer de reacción NH₄ 10X, 3µl de MgCl₂ 50 mM, 3µl de mezcla de dNTPs 10mM, 2.5µl

de cada oligonucleótido 10mM, 7 μ l del DNA templado y 0.5 μ l de taq DNA polimerasa (Cat. No. BIO-21042, BIOLINE). El programa empleado en el termociclador fue: 5 minutos de desnaturalización a 94°C seguida de 30 ciclos utilizando 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C para el alineamiento de los oligonucleótidos y 90 segundos de extensión a 70°C. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y fue corrido en buffer TAE (2M Tris-Base, 0.5M EDTA, ácido acético pH 8) por 30 minutos a 80v y tinción con bromuro de etidio. Se empleó marcador de DNA lineal (Cat. No. BIO-33054, BIOLINE) para ubicar el tamaño de los amplificados y una banda de 650 pb se tomó como una detección positiva del DNA de *E. faecalis*.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de las nanopartículas de bismuto BisBAL

Las nanopartículas de bismuto sintetizadas fueron de forma esférica y con un diámetro menor a 100 nm (Figura 1). Las nanopartículas se aglomeraron en acúmulos en forma de racimos como material electro-denso (Figura 1). Mediante el uso del software al analizar las imágenes por SEM se pudo obtener los espectros EDS, permitiendo identificar la composición elemental del área seleccionada y se confirmó la presencia de bismuto (Figura 1). De forma adicional se corroboró la identidad de bismuto mediante la obtención de su espectro de difracción de rayos X, confirmando su patrón característico al igual que su espectro por UV-visible (Figura 1). En resumen se confirmó con toda certeza la identidad de bismuto, las nanopartículas presentaron un tamaño promedio de 28 nm con grupos químicos di-tioles en su superficie los cuales le confieren propiedad lipofílica a las BisBAL NPs. A partir de una solución stock de nanopartículas de bismuto 50mM se desarrolló el gel basado en carbopol y su estabilidad tanto a temperatura ambiente como a 4°C se corroboró hasta por 3 meses de almacenamiento.

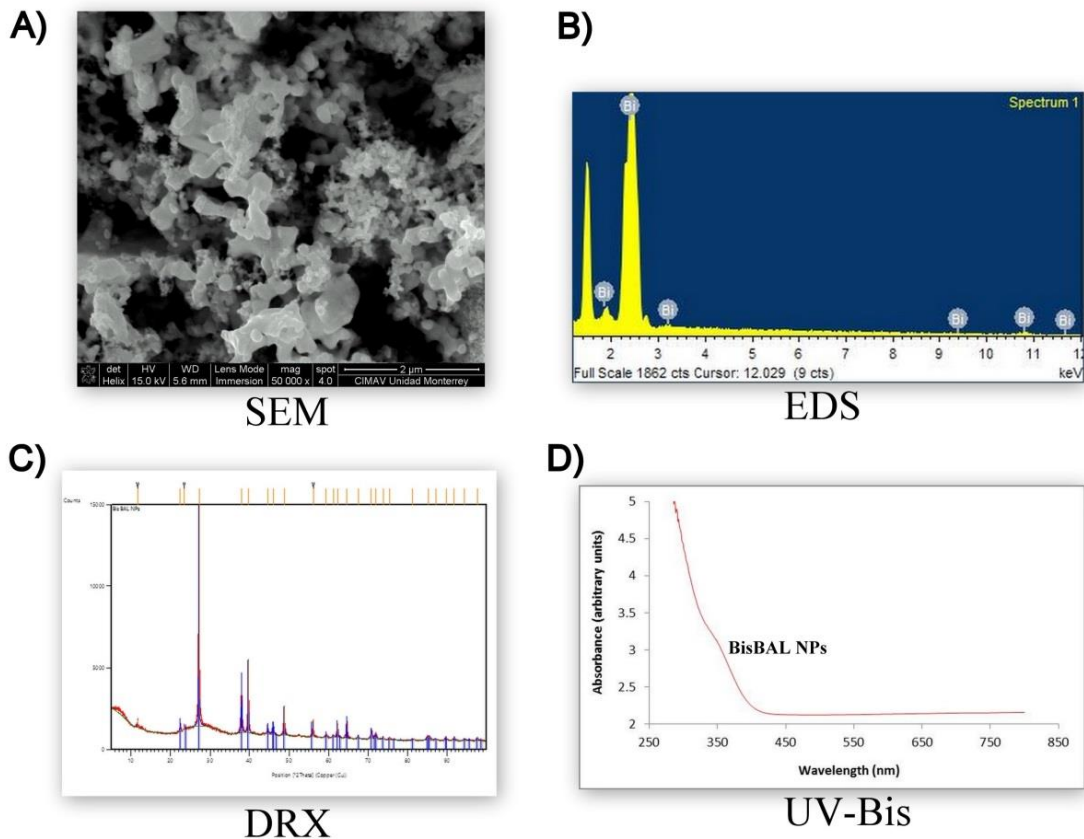


Figura 1. Caracterización de las nanopartículas de bismuto. A) Nanopartículas de bismuto observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM). La forma predominante fue esférica y con un tamaño promedio de 28 nm en acúmulos electrodensos. B) Mediante la obtención del espectro EDS se identificó la composición elemental de lo observado por SEM. Finalmente la identidad de bismuto fue corroborada por difracción de rayos y espectrofotometría de UV.)

6.2 Caracterización del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL por SEM

El hidrogel-BisBAL NPs mostro una viscosidad importante para permanecer sobre superficie sin derramarse y con apariencia en color azul (figura 2A). Al examinarse por microscopía electrónica de barrido (SEM) se pudo identificar la presencia de clusters electrodensos compuestos de las nanopartículas BisBAL (figura 2 C y D),

mostrando una apariencia en forma de “dona”. La identidad química de las nanoestructuras al interior del gel se corrobora por espectro EDS seleccionando un área del gel bajo observación por SEM, identificando así al bismuto como principal componente (figura 2B).

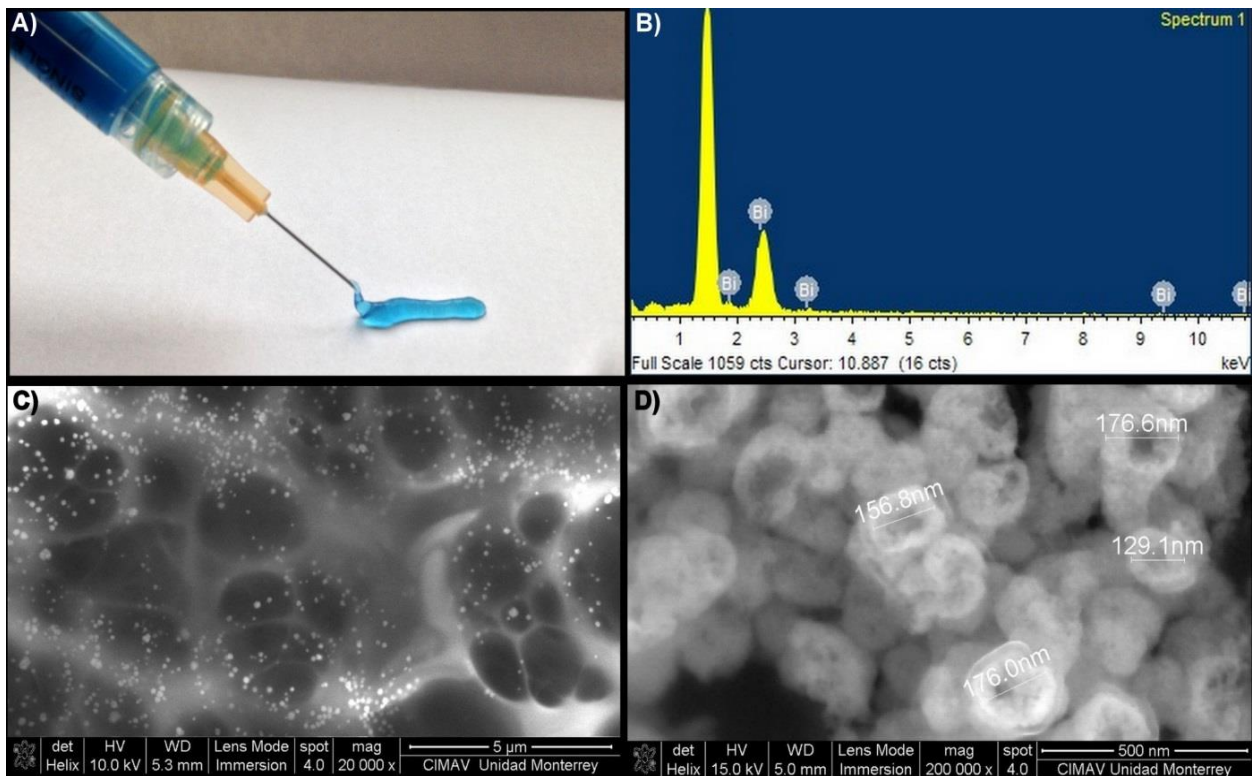


Figura 2. Caracterización del hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBAL NPs) por microscopía electrónica de barrido (SEM).

6.3 Actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL sobre patógenos orales

Para confirmar que las propiedades antimicrobianas de las BisBAL NPs no se modificarán una vez que se incorporaron al gel, se evaluó esta propiedad

mediante ensayos de difusión en disco. Los resultados que se muestran en la tabla 1 indican que el hidrogel-BisBAL NPs inhibió el crecimiento de los patógenos orales presentando un halo promedio de 20.2 mm de diámetro. Mientras que al utilizar hidróxido de calcio no se inhibió el crecimiento de ninguno de los microorganismos analizados bajo las condiciones experimentales utilizadas. Por lo tanto estos resultados nos sugerían que el hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL posee excelente actividad antimicrobiana que mostraron ser superiores al hidróxido de calcio y que era estable por tiempos prolongados.

Tabla 1. Actividad Antimicrobiana del Hidrogel cargado con BisBAL NPs

Microorganismo	Tratamiento*	
	Gel-BisBAL NPs	Ca(OH) ₂
<i>Enterococcus faecalis</i>	28	0
<i>Streptococcus gordonii</i>	22	0
<i>Streptococcus sobrinus</i>	25	0
<i>Streptococcus mutans</i>	22	0
<i>Escherichia coli</i>	20	0
<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	13	0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	11	0
<i>Candida albicans</i>	12	0

*Los resultados son expresados como mm de halo de inhibición del crecimiento microbiano después de 24h. Los experimentos fueron realizados por triplicados y el promedio de estos experimentos es mostrado.

6.4 Transformación de *Enterococcus faecalis* con el plásmido pDsRed2

Con el objetivo de generar una cepa recombinante de *E. faecalis* que expresara de forma estable a la proteína roja fluorescente (DsRed), la cepa silvestre de *E. faecalis* se transformó con el plásmido pDsRed2 mediante la técnica de choque térmico. La cepa recombinante generada (pDsRed2-*E. faecalis*) se creció en medio selectivo (suplementado con Ampicilina 50 µg/mL) y el plásmido se extrajo mediante lisis alcalina. La figura 2a muestra el patrón electroforético del DNA plasmídico del pDsRed2 extraído de la bacteria recombinante en un gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La cepa silvestre muestra la ausencia de plásmido (Figura 2a, línea 2) mientras que el plásmido control (Figura 2a, línea 3) coincide con el tamaño del plásmido extraído de la bacteria recombinante. Por lo tanto se construyó una herramienta fundamental para estudiar el biofilm de *E. faecalis* por microscopia de fluorescencia sin necesidad de realizar tinciones que podrían alterar el resultado.

6.5 Curva de crecimiento de la cepa recombinante pDsRed2-*E. faecalis* y cepa silvestre de *E. faecalis*

Con el objetivo de descartar si la presencia del DNA plasmídico podría modificar el crecimiento de la cepa recombinante, se realizó una cinética de 24 h para evaluar si crecimiento en comparación con la cepa silvestre. Como se puede apreciar en la figura 2b el crecimiento de la cepa recombinante es idéntico al de la cepa silvestre de *E. faecalis* sugiriendo que la expresión de los genes plasmídicos no interfieren

con el crecimiento de *E. faecalis* y puede ser utilizada como modelo experimental de biofilm endodóntico.

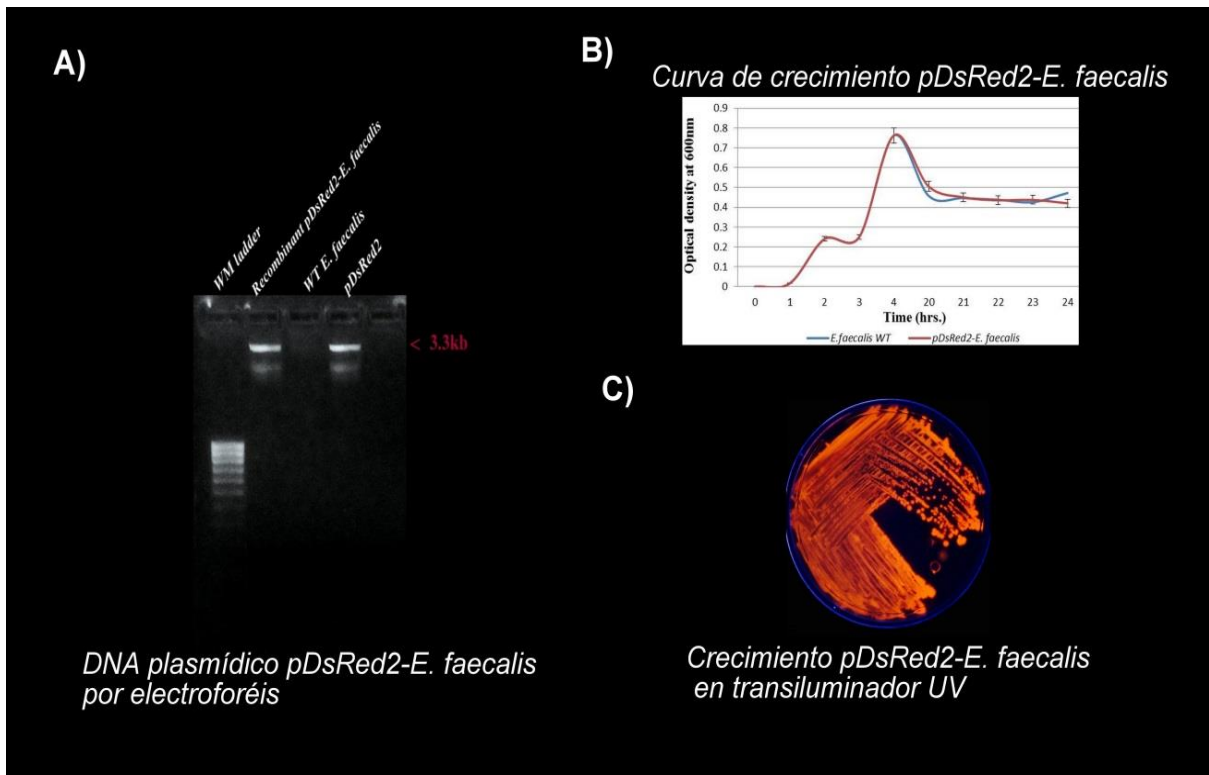


Figura 3. Desarrollo de una cepa fluorescente recombinante de *Enterococcus faecalis*. A) *E. faecalis* recombinante (pDsRed2-*E. faecalis*) se creció en medio selectivo y el DNA plasmídico fue extraído por lisis alcalina y analizado por electroforesis y tinción con bromuro de etidio. B) Curva de crecimiento de *E. faecalis* cepa silvestre y recombinante durante 24h. C) Colonias de la cepa recombinante pDsRed2-*E. faecalis* creciendo en medio selectivo y expresando la proteína roja fluorescente y visualizada por transiluminador de UV.

6.6 Actividad antibiofilm in vitro del hidrogel-BisBAL NPs sobre el biofilm *E. faecalis*

Para explorar la efectividad antibiofilm del gel-BisBAL NPs la cepa recombinante pDsRed2-*E. faecalis* se cultivó en placas de 96-pozos por 24 h y este biofilm formado se expuso al hidrogel-BisBAL NPs, Gel solo sin nanopartículas o a hidróxido de calcio por 24 h y el biofilm remanente se observó por microscopía de fluorescencia. Como se puede apreciar en la figura 3 el control de crecimiento muestra el biofilm formado durante 24 h por pDsRed2-*E. faecalis*, mientras que el tratamiento con el hidrogel-BisBAL NPs muestra un fondo oscuro sin señal fluorescente. Cuando el biofilm se trató con gel solo sin nanopartículas no hubo efecto significativo ya que se observa muy similar al control de crecimiento y lo mismo ocurre con el tratamiento con hidróxido de calcio. Al cuantificar la intensidad fluorescente de la proteína roja fluorescente presente en el biofilm formado se obtuvieron los siguientes datos: el hidrogel-BisBAL NPs removió el 99% del biofilm, mientras que el hidróxido de calcio solo removió un 16% y el gel solo sin nanopartículas 6%. En conjunto estos resultados sugieren fuertemente que el hidrogel-BisBAL NPs es eficaz para desprender el biofilm endodóntico y muy superior al tratamiento convencional con hidróxido de calcio.

Desprendimiento de biofilm pDsRed2-*E. faecalis* por gel-BisBAL NPs

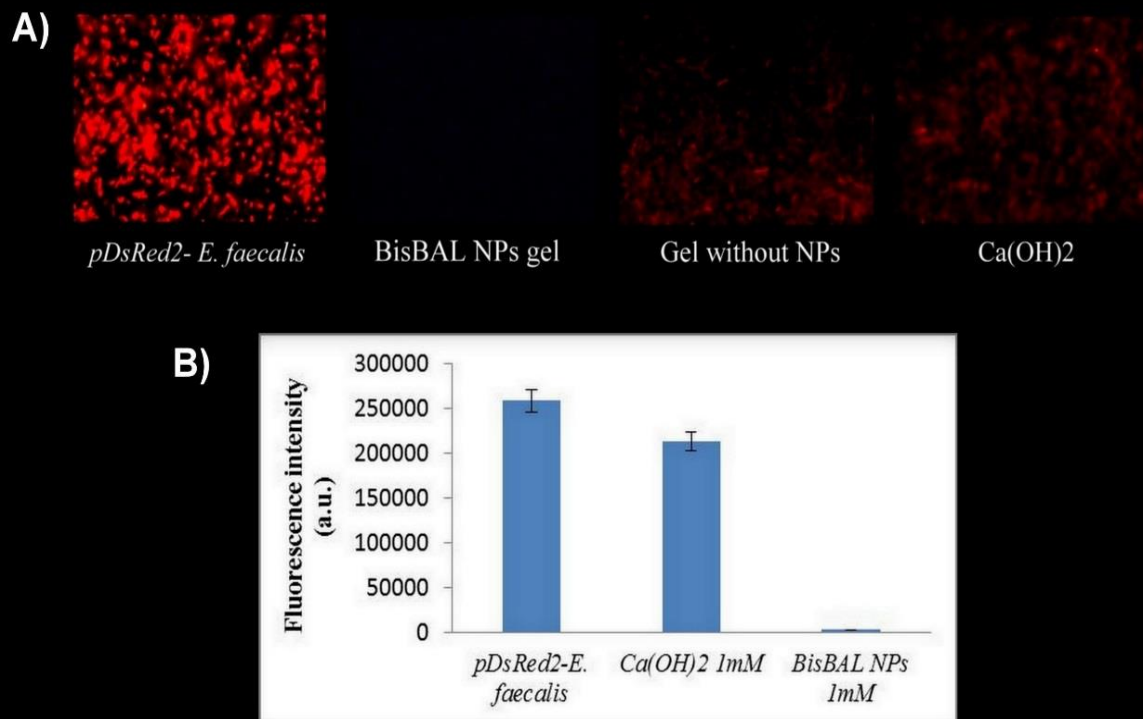


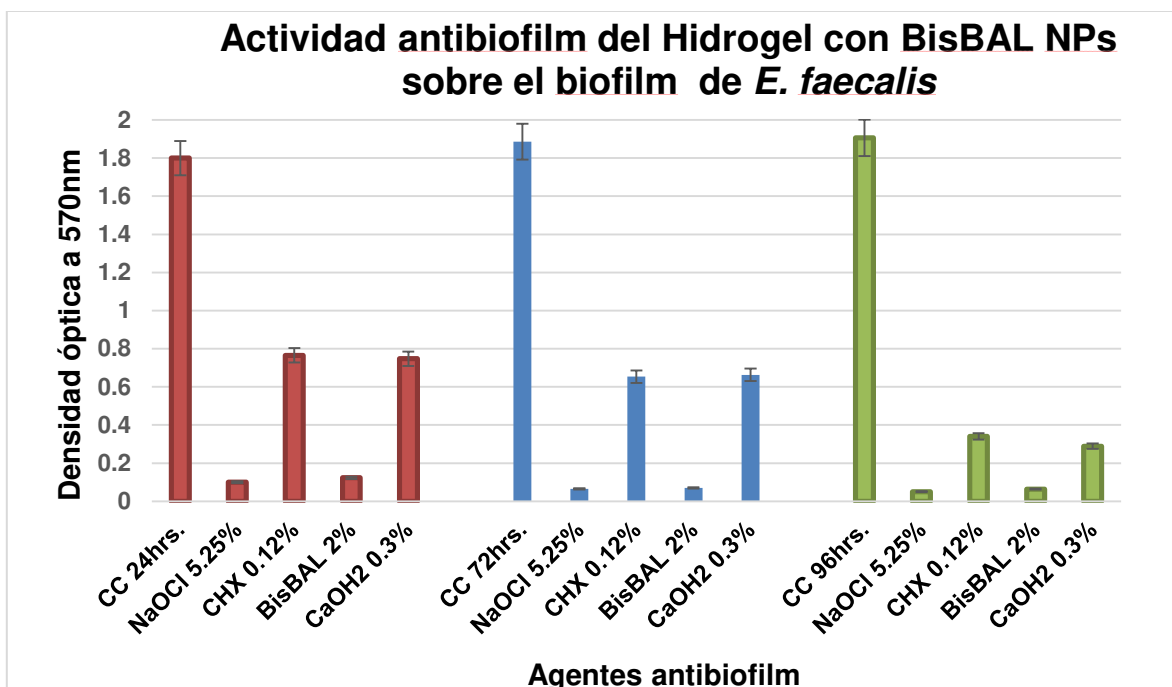
Figura 4. Actividad antibiofilm del hidrogel-BisBAL NPs. A) La cepa recombinante de *E. faecalis* fue cultivada en placas de 96-pozos por 24h y se añadió el hidrogel-BisBAL NPs, hidróxido de calcio o nada durante 24h más y luego se observó el biofilm por microscopía de fluorescencia a 582nm (Thornwood, NY). B) El experimento descrito en A) se empleó para cuantificar la intensidad fluorescente de las muestras observadas y el promedio de la medición por triplicado es mostrado en la gráfica.

6.7 Desprendimiento del biofilm de *E. faecalis* intraconducto mediante el hidrogel-BisBAL NPs

Los resultados descritos en el párrafo anterior muestran el potencial antibiofilm del hidrogel-BisBAL NPs sobre el biofilm formado por *E. faecalis*, sin embargo hay que señalar que el modelo experimental está lejos de imitar las condiciones que presentan los pacientes, es decir la porosidad del diente, estructura, presencia de

nutrientes, etc. Por lo tanto la pregunta que nos planteamos fue si en esas condiciones el hidrogel-BisBAL NPs sería igualmente de eficaz. Para evaluar esta hipótesis se desarrolló una variante de biofilm fluido intraconducto preparando una pieza dental uniradicular extraída por tratamiento ortodóntico. Se desarrolló el biofilm intraconducto por *E. faecalis* durante 10 días (Figura 4Ai) y posteriormente se adiciono el hidrogel-BisBAL NPs (Figura 4Aii), hidróxido de calcio (Figura 4Aiii) o nada (Figura 4Aiv) por 24 h y posteriormente se observó el biofilm remanente en conducto mediante SEM y microscopia de fluorescencia, además de detectar la presencia específica del DNA de *E. faecalis* mediante PCR. Como puede apreciarse en la figura 4A, *E. faecalis* es detectado intraconducto adherido y se identificó de forma específica que se trata de *E. faecalis* al confirmarse por PCR (Fig 4C, línea 2). Los resultados obtenidos al exponer el biofilm de *E. faecalis* de 10 días al tratamiento experimental fue que el hidrogel-BisBAL NPs removió todo el biofilm de *E. faecalis* observándose el conducto radicular libre de biofilm bacteriano ausente de cualquier señal fluorescente en comparación con el biofilm control que se observa en color rojo el biofilm de *E. faecalis* intraconducto (Figura 4B). Finalmente con la intención de analizar la veracidad de las observaciones realizadas por SEM y microscopía de fluorescencia, se buscó en las mismas muestras la presencia de *E. faecalis* realizando un raspado intraconducto y extrayendo el DNA total de dicha muestra. La presencia de *E. faecalis* se determinó por PCR y los posibles amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La figura 5C muestra que la amplificación de la muestra control (sin ningún tratamiento, figura 5C línea 2) presenta una banda amplia que coincide con el peso molecular esperado de 650

pb. El grosor de la banda es relativamente proporcional a la cantidad de bacterias presente en el conducto. En el caso de la muestra tratada con el gel-BisBAL NPs se detectó una banda muy delgada apenas detectable por electroforesis y al ser comparada con la muestra control se estimó al menos 10 veces menos cantidad de bacteria con 24 h de tratamiento. En el caso del tratamiento con hidróxido de calcio se identificó una banda similar a la del control de crecimiento, coincidiendo tanto con los resultados observados en fluorescencia como en los ensayos *in vitro*. En resumen los resultados obtenidos con el modelo de biofilm intraconducto se corrobora la alta efectividad del gel-BisBAL NPS para remover el biofilm formado por *E. faecalis*, siendo muy superior al tratamiento convencional con hidróxido de calcio, convirtiéndose en una alternativa innovadora para el tratamiento de las infecciones endodónticas.



Desprendimiento de biofilm *pDsRed2-E. faecalis* intrarradicular por gel-BisBAL NPs

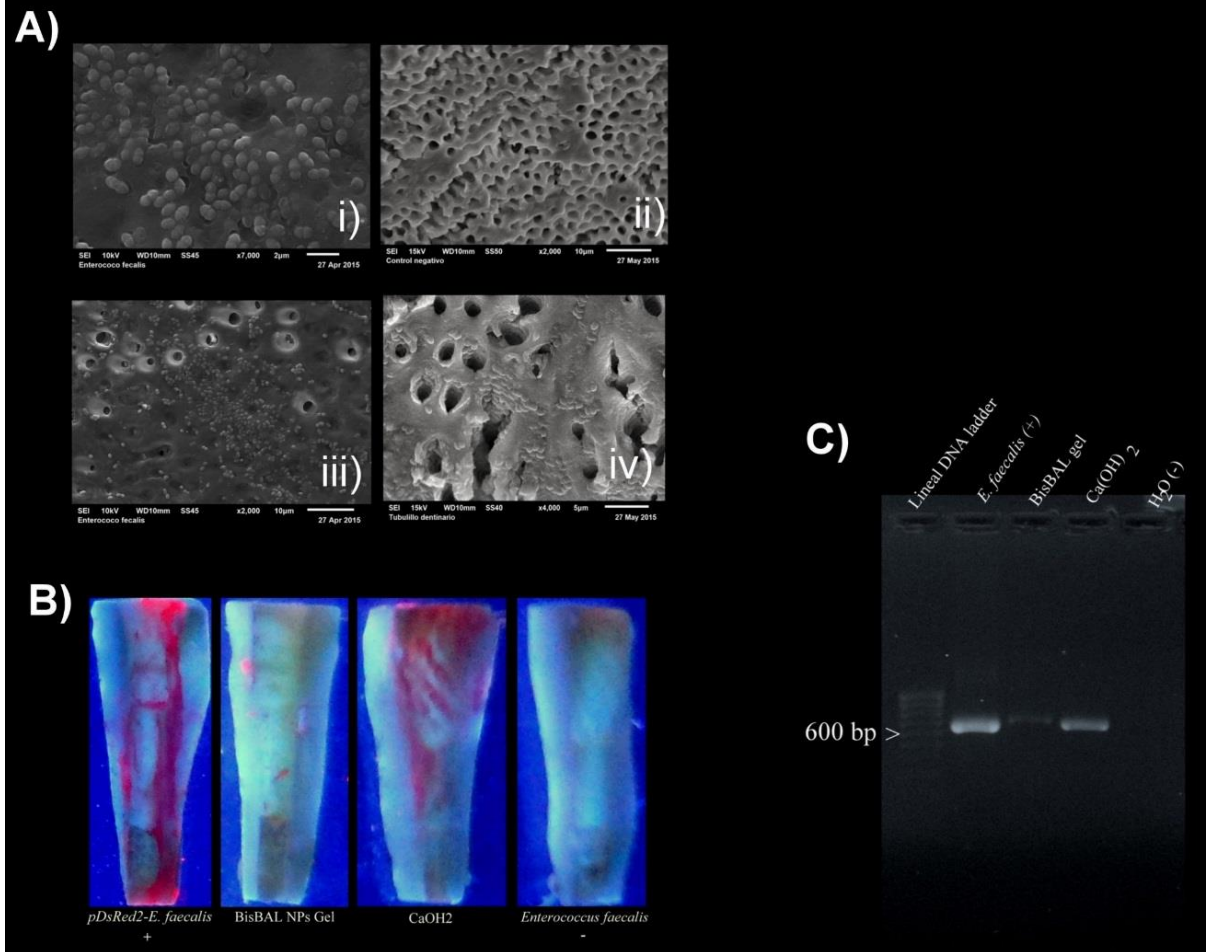
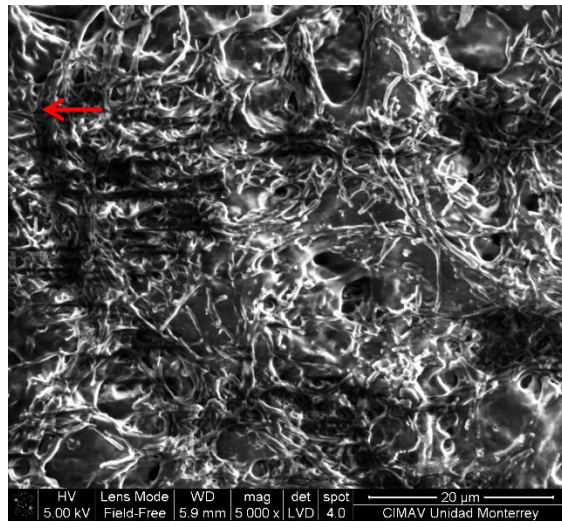
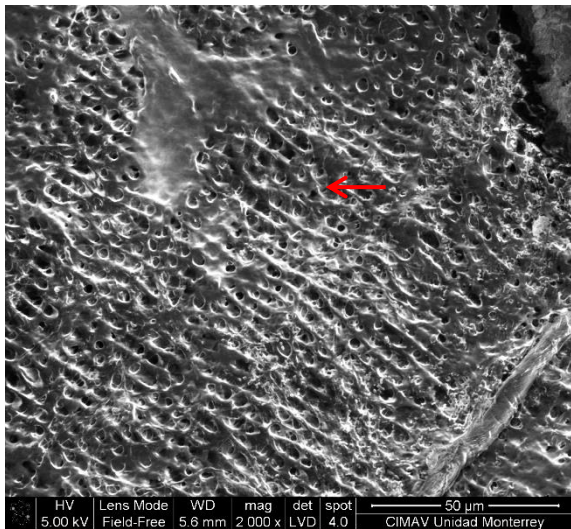
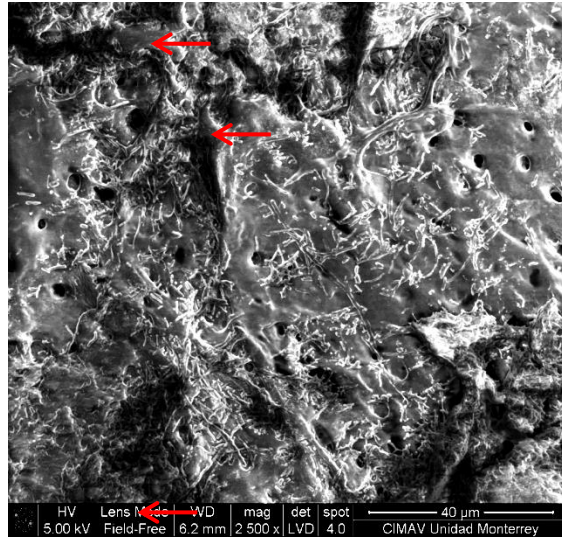
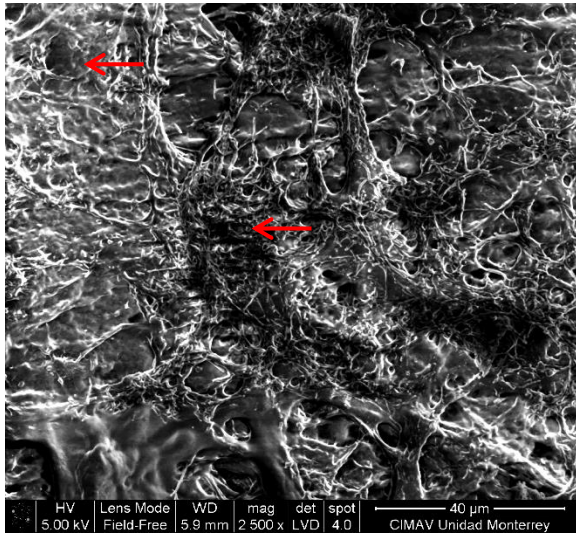
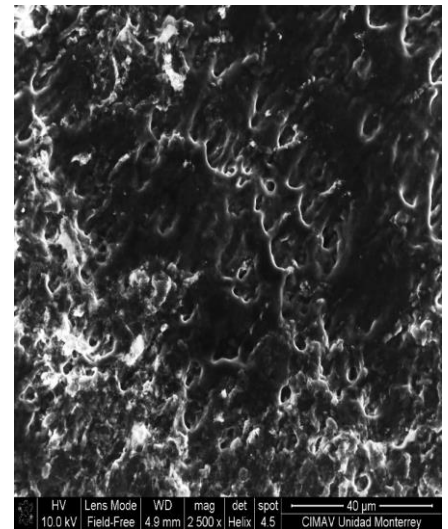
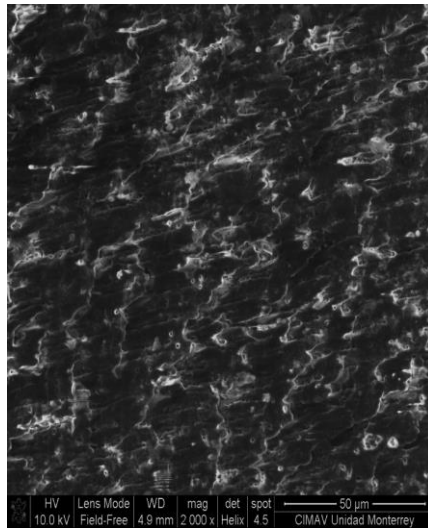
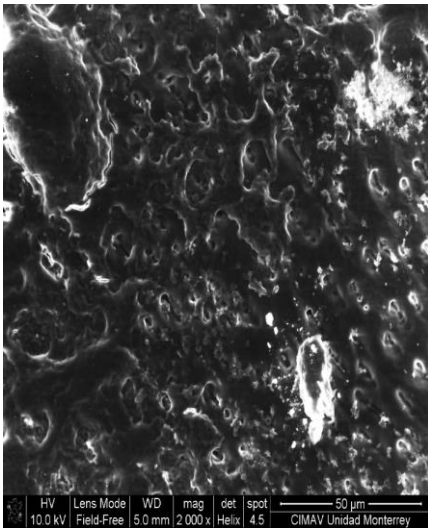


Figura 5. Desprendimiento del biofilm de *E. faecalis* intraconducto por el hidrogel-BisBAL NPs. A) A un biofilm de 5 días de formación (Ai) se agregó el hidrogel-BisBAL-BAL (Aii), hidróxido de calcio (Aiii) o nada (Aiv) durante 24h y el biofilm de *E. faecalis* fue analizado por microscopía electrónica de barrido y microscopía fluorescente (B). C) El DNA bacteriano específico de *E. faecalis* fue detectado a partir de muestras de raspado radicular mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Una banda de 650 pb fue tomada como amplificación positiva de *E. faecalis*.

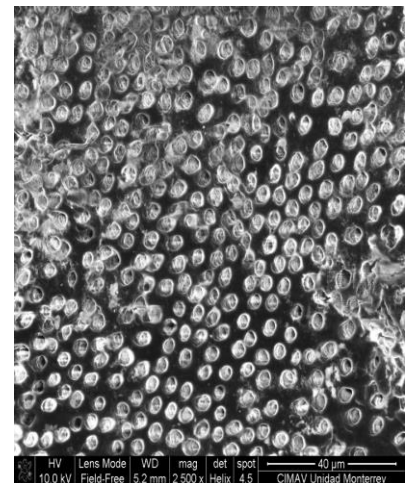
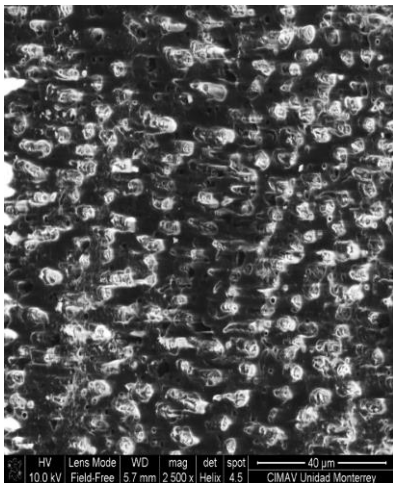
Biofilm de *E. faecalis* de 7 días sobre dentina



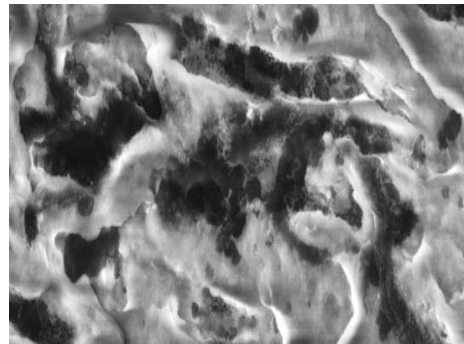
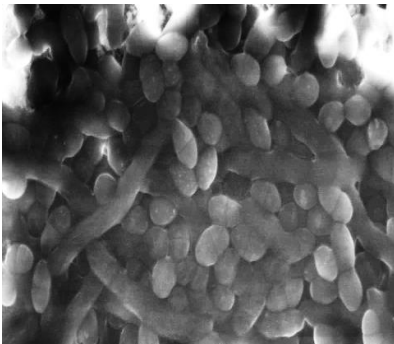
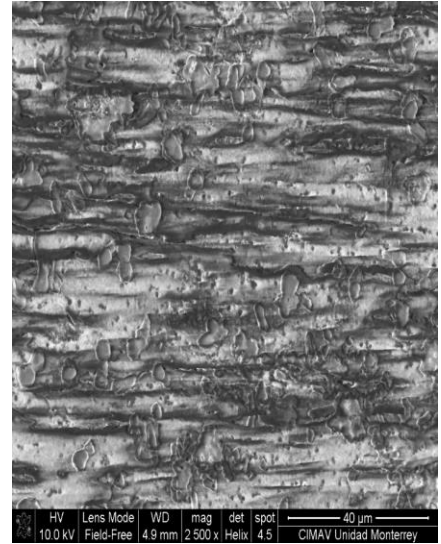
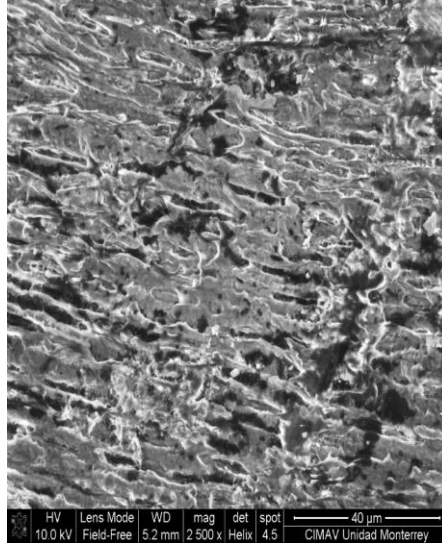
Tratamiento con hidrogel BisBAL NPs



Tratamiento con NaOCl 5.25%



Tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$



7. DISCUSIÓN

El objetivo del tratamiento endodóntico consisten en desinfectar y limpiar el conducto radicular de todo tejido infectado y preparar el conducto con cemento minimizando cualquier cambio o reinfección [18]. Sin embargo falla en el tratamiento endodóntico no es algo extraño y los factores más comunes que contribuyen son: *persistencia de bacterias*, inadecuado llenado del canal, sellamiento incorrecto, canales radiculares no tratados, etc. El rol de las bacterias creciendo en biofilm intraconducto, túbulos dentinarios y ramificaciones han sido asociadas a fallo del tratamiento endodóntico debido probablemente a la evasión de los desinfectantes (hipoclorito de sodio o clorhexidina) [19, 20]. o a un tiempo muy corto de exposición a estos [21, 22]. La probabilidad de un tratamiento exitoso es más alta cuando se ha realizado una limpieza y desinfección completa del canal radicular infectado.

En este trabajo se presenta evidencia acerca de la efectividad antibiofilm de un hidrogel cargado con nanopartículas de bismuto para desprender el biofilm formado por *E. faecalis* intraconducto. Varios autores han empleado nanopartículas de plata en solución como vehículo para inhibir el biofilm de *E. faecalis* [23-25]. Sin embargo esos estudios poseen la limitación de ser *in vitro* empleando placas de poliestireno que favorecen la adhesión bacteriana y que no representan las mismas condiciones de biofilm endodóntico en los pacientes. Nuestros resultados muestran que con 24 h de exposición con el hidrogel-BisBAL NPs es suficiente para remover el biofilm formado por 21 días intraconducto,

mientras que el tratamiento convencional solo desprendió el 16% del biofilm de *E. faecalis*. Estos resultados no sorprenden ya que muchos autores han cuestionado la eficacia antimicrobiana del hidróxido de calcio [26, 27] sin embargo sigue empleándose hasta por 15 días en los pacientes debido a la ausencia de alternativas de tratamiento.

De forma adicional cabe señalar que para demostrar la eficacia del hidrogel-BisBAL NPs se desarrollaron nuevas herramientas metodológicas como fue la cepa recombinante de pDsRED2-*E. faecalis* y el modelo de biofilm intraconducto. Ambas metodologías permitirán estudiar todos los fenómenos moleculares y celulares involucrados en el desarrollo de las infecciones endodónticas.

El mecanismo de acción mediante el cual el hidrogel-BisBAL NPs desprende el biofilm de *E. faecalis* es desconocido aun, pero hipotetizamos que la presencia de nanopartículas de bismuto con alta actividad antimicrobiana de forma permanente y prolongada termina por matar a las bacterias que componen el biofilm endodóntico. El hecho de que se detectara casi nada de *E. faecalis* por PCR que es una herramienta altamente sensible apoya esta hipótesis, sugiriendo que las nanopartículas de bismuto estarían penetrando hasta todas las bacterias que componen el biofilm. Previamente se describió que un gel al 2% de clorhexidina mostro alta actividad antimicrobiana y antibiofilm contra *E. faecalis*[28]. Este dato presenta similitud con nuestro estudio sugiriendo que una mayor exposición lograda con el gel muestra mayor eficacia antimicrobiana que el empleo de irrigación con desinfectantes.

8. CONCLUSIONES

Aquí presentamos evidencia por primera vez acerca de la eficacia antimicrobiana y antibiofilm intraconducto de un hidrogel cuyo principio activo son nanopartículas lipofílicas de bismuto. Supero con claridad al tratamiento comercial actual con hidróxido de calcio por lo que constituye una alternativa innovadora para el tratamiento de las infecciones endodónticas.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Afkhami, F., et al., *Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against Enterococcus faecalis*. J Dent, 2015. **43**(12): p. 1573-9.
2. Badireddy, A., et al., *Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation*. Journal of Nanoparticle Research, 2014. **16**(6): p. 1-12.
3. Costerton, J.W., *Overview of microbial biofilms*. J Ind Microbiol, 1995. **15**(3): p. 137-40.
4. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(9): p. 881-90.
5. Fang, H.H., K.Y. Chan, and L.C. Xu, *Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM)*. J Microbiol Methods, 2000. **40**(1): p. 89-97.
6. Fessler, A.T., et al., *Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(8): p. 1576-82.
7. Fouad, A.F., et al., *Molecular detection of Enterococcus species in root canals of therapy-resistant endodontic infections*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005. **99**(1): p. 112-8.

8. Goeres, D.M., et al., *A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor*. Nat Protoc, 2009. **4**(5): p. 783-8.
9. Gomes, B.P., et al., *Chlorhexidine in endodontics*. Braz Dent J, 2013. **24**(2): p. 89-102.
10. Goncalves, L.S., et al., *The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials*. J Endod, 2016. **42**(4): p. 527-32.
11. Havaei, S.A., et al., *Detection of mecA and enterotoxin genes in Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis and characterization of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in MRSA strains*. Iran J Microbiol, 2015. **7**(3): p. 161-7.
12. Hernandez-Delgado, R., et al., *Effect of Lipophilic Bismuth Nanoparticles on Erythrocytes*. Journal of Nanomaterials, 2015. **2015**: p. 9.
13. Javidi, M., et al., *Efficacy of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide root canal medication on elimination of Enterococcus faecalis*. Aust Endod J, 2014. **40**(2): p. 61-5.
14. Kim, D. and E. Kim, *Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies*. Restor Dent Endod, 2014. **39**(4): p. 241-52.
15. Kishen, A., S. George, and R. Kumar, *Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro*. J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(2): p. 406-15.

16. Lin, L.M., et al., *Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1991. **71**(5): p. 603-11.
17. Lin, L.M., J.E. Skribner, and P. Gaengler, *Factors associated with endodontic treatment failures*. J Endod, 1992. **18**(12): p. 625-7.
18. Marcheggiani, S., et al., *Detection of emerging and re-emerging pathogens in surface waters close to an urban area*. Int J Environ Res Public Health, 2015. **12**(5): p. 5505-27.
19. Matz, M.V., et al., *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 969-73.
20. Maurer, J.J., *Rapid detection and limitations of molecular techniques*. Annu Rev Food Sci Technol, 2011. **2**: p. 259-79.
21. Mohammadi, Z., et al., *Microbial biofilms in endodontic infections: an update review*. Biomed J, 2013. **36**(2): p. 59-70.
22. Svensäter, G. and G. Bergenholtz, *Biofilms in endodontic infections*. Endodontic Topics, 2004. **9**(1): p. 27-36.
23. Tabassum, S. and F.R. Khan, *Failure of endodontic treatment: The usual suspects*. Eur J Dent, 2016. **10**(1): p. 144-7.
24. Taneja, S., et al., *Antimicrobial effect of an oxazolidinone, lantibiotic and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis biofilm: An in vitro study*. Indian J Dent, 2015. **6**(4): p. 190-4.
25. Tsaur, S.M., et al., *Antimicrobial susceptibility of enterococci in vitro*. J Formos Med Assoc, 1993. **92**(6): p. 547-52.
26. Turk, B.T., B.H. Sen, and T. Ozturk, *In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against Enterococcus faecalis and*

- Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009. **108**(2): p. 297-301.
27. Zhang, F.H., et al., [*The effect of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide medication on the biofilm of Enterococcus faecalis in starvation phase*]. Shanghai Kou Qiang Yi Xue, 2016. **25**(1): p. 11-5.
28. Dankovich TA, Gray DG (2011) Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment. Environ Sci Technol 45:1992–1998
29. Y.Luo, C.Wang, Y.Qiao, M.Hossain, L.Ma, and M.Su, "Invitro cytotoxicity of surface modified bismuth nanoparticles," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 23, no. 10, pp. 2563–2573, 2012
30. Badireddy, A. et al, Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation, J Nanopart Res 2014, 16:2456 .
31. Hernandez-Delgadillo, R., et al., Cytotoxic Effect of Lipophilic Bismuth Dimercaptopropanol Nanoparticles on Epithelial Cells, J of Nanoscience Nano, 2015, 15:1-7.
32. P. Nazari, R. Dowlatabadi-Bazaz, M. R. Mofid, M. R. Pourmand, N. E. Daryani, M. A. Faramarzi, Z. Sepehrizadeh, and A. R. Shahverdi, Appl. Biochem. Biotechnol. (2013).
33. Louwakul P, et al, Efficacy of calcium oxide and calcium hydroxide nanoparticles on the elimination of Enterococcus faecalis in human root dentin, Clin Oral Investig 2016 1-7.