

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DEL CEMENTO
SELLADOR AH PLUS SUPLEMENTADO CON NANOPARTÍCULAS
LIPOFÍLICAS DE BISMUTO SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC 11420,
CULTIVO MIXTO y *E. faecalis* AISLADO DE CONDUCTOS RADICULARES”**

POR

C.D. JESÚS ALEJANDRO TORRES BETANCOURT

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ENDODONCIA**

Junio, 2021

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia.

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DEL CEMENTO SELLADOR
AH PLUS SUPLEMENTADO CON NANOPARTÍCULAS LIPOFÍLICAS DE
BISMUTO SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC 11420, CULTIVO MIXTO y *E.*
faecalis AISLADO DE CONDUCTOS RADICULARES”

C.D. JESÚS ALEJANDRO TORRES BETANCOURT

Comité de tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia.

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DEL CEMENTO SELLADOR
AH PLUS SUPLEMENTADO CON NANOPARTÍCULAS LIPOFÍLICAS DE
BISMUTO SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC 11420, CULTIVO MIXTO y *E.*
faecalis AISLADO DE CONDUCTOS RADICULARES”

TESISTA

C.D. JESÚS ALEJANDRO TORRES BETANCOURT

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 mi padre, por apoyarme en cada decisión tomada desde que tengo memoria, por educarme con la seguridad de pensar que nada es imposible, por cada día creer y confiar en mí, por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida, por siempre mantenerse fuerte y con buena cara aún en las situaciones más difíciles, por nunca rendirse y nunca dejar que nos rindamos.

A mi novia, quien ha sido mi apoyo incondicional en cualquier hora, cualquier momento, quien ha visto mejor que nadie, lo mucho que me costó llegar hasta aquí, gracias por ser quien siempre me tendió la mano para ofrecerme ayuda, quien siempre me recibía con un abrazo cuando las cosas no salían bien, siempre con una celebración cuando todo salía perfecto, gracias a ti que eres mi inspiración y mi motivación.

Agradezco de igual manera al Dr. Jorge Jaime Flores Treviño, profesores, Dr. Claudio Cabral Romero y al Dr. Rene Hernández Delgadillo asesores y directores de gran sabiduría quienes supieron guiarme con paciencia y entera disposición hasta llegar al punto en el que me encuentro, ustedes que a pesar de tener vida propia dedican gustosamente su tiempo para enseñar, compartir y trascender a través de las palabras de nosotros como estudiantes, gracias por dar la pauta y dirección que nos hace expandir nuestros conocimientos.

Por último, me gustaría agradecer a mi Alma Mater, la Universidad Autónoma de Nuevo León y a mi Facultad de Odontología por abrirme las puertas desde hace 8 años, por generarme conocimientos, aptitudes, habilidades y destrezas que me permiten estar aquí el día de hoy.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo General	13
3.2 Objetivos Específicos.....	13
4. ANTECEDENTES	14
4.1 Obturación del conducto radicular.	14
4.2 Materiales de obturación.....	14
4.3 Tipos de cementos selladores	15
4.3.1 Óxido de zinc	16
4.3.2 Hidróxido de calcio.....	16
4.3.3 Biocerámicos.....	16
4.3.4 Polímeros	16
4.4 Propiedades ideales de un cemento sellador	17
4.4.1 Efectos antimicrobianos y antibiofilm.....	17
4.4.2 Biocompatibilidad.....	18
4.5 Cemento AH Plus.....	18
4.6 Fracaso endodóntico.....	19
4.6.1 Infecciones persistentes.....	20
4.6.2 <i>Enterococcus Faecalis</i>	21
4.6.3 <i>Biofilms humanos</i>	23
4.6.4 <i>Biofilm endodóntico</i>	24
4.7 Métodos para estudiar el biofilm endodóntico.	25
4.8 Bismuto	26
4.9 Nanotecnología	26
4.10 Nanotecnología en Odontología	27
4.11 Nanopartículas de bismuto	28
4.12 Suplementación de cemento sellador AH Plus.....	30

5. MATERIAL Y METODOS.....	32
5.1 Cultivo microbiano.....	33
5.2 Obtención de microorganismos aislados de pacientes.	33
5.3 Síntesis de nanopartículas de BisBAL.....	34
5.4 Caracterización de nanopartículas de BisBAL.	34
5.5 Desarrollo del cemento sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs.	35
5.6 Caracterización del cemento sellador AH Plus-BisBAL NPs por microscopía electrónica de barrido.	35
5.7 Detección de <i>Enterococcus faecalis</i> en muestras obtenidas mediante PCR en tiempo real (qPCR).	36
5.8 Actividad antimicrobiana del AH Plus-BisBAL NPs.	36
5.9 Actividad antibiofilm del AH Plus-BisBAL NPs.	36
5.10 Ensayo de microfiltración de AH Plus-BisBAL NPs.....	37
5.11 Citotoxicidad del AH Plus-BisBAL NPs.....	38
5.12 Análisis estadístico.....	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1 Caracterización de las nanopartículas de bismuto.	39
6.2 Caracterización del cemento sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs por microscopía electrónica de barrido (SEM).	40
6.3 Detección de <i>Enterococcus faecalis</i> en muestras obtenidas mediante PCR en tiempo real (qPCR).	41
6.4 Actividad antimicrobiana del cemento sellador AH Plus - BisBAL NPs por ensayo de difusión en disco.	42
6.5 Actividad antibiofilm del cemento sellador AH Plus-BisBAL NPs.....	43
6.6 Ensayo de microfiltración.	44
6.7 Citotoxicidad del cemento sellador AH Plus-BisBAL NPs.	45
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	49
9. REFERENCIAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Caracterización de las BisBAL NPs por SEM.....	42
2. Caracterización de cemento sellador suplementado con BisBAL NPs por SEM.....	43
3. Identificación de <i>E. faecalis</i> mediante PCR en tiempo real.....	44
4. Actividad antimicrobiana de AH plus + BisBAL NPs ensayo de difusión en disco.....	45
5. Actividad antibiofilm de AH plus + BisBAL NPs por microscopía de fluorescencia....	46
6. Ensayo de capacidad de sellado por cámara dividida.....	47
7. Viabilidad celular mediante ensayo MTT con cementoblastos humanos.....	48

LISTA DE TABLAS

1. Tabla #1. Composición química del cemento sellador AH Plus.....	21
2. Tabla #2 Actividad antimicrobiana de AH Plus con BisBAL NPs.....	45

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

BisBAL NPs	Nanopartículas de bismuto
SEM	Microscopia electrónica de barrido
ZOE	Óxido de zinc y eugenol
CaOH ₂	Hidróxido de calcio
MIC	Concentración mínima inhibitoria

RESUMEN

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DEL CEMENTO SELLADOR AH PLUS SUPLEMENTADO CON NANOPARTÍCULAS LIPOFÍLICAS DE BISMUTO SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC y *E. faecalis* AISLADO DE CONDUCTOS RADICULARES.

Jesús Alejandro Torres Betancourt¹; Claudio Cabral Romero²; Jorge Jaime Flores Treviño¹, Rene Hernández Delgadillo². Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Odontología, Posgrado de Endodoncia¹, Laboratorio de Biología Molecular², alejandro_bt@outlook.es

Introducción: La presencia de biofilm intraconducto se ha asociado al fracaso, debido a la evasión de los agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio o clorhexidina, por ello es urgente sintetizar nuevos agentes antimicrobianos de amplio espectro y bajo costo para el tratamiento de patógenos multirresistentes. La nanotecnología ofrece un gran potencial para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos localizados intraconducto. **Objetivo:** Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm del cemento sellador AH Plus suplementado con nanopartículas de bismuto (BisBAL NPs) para inhibir el crecimiento de biofilms de *Enterococcus faecalis* ATCC, cultivo mixto y *E. faecalis* aislado de conductos radiculares. **Materiales y métodos:** La caracterización del sellador AH Plus con BisBAL NPs se realizó por SEM. La actividad antimicrobiana del cemento sellador se determinó mediante el ensayo de difusión en disco, la actividad antibiofilm se analizó mediante microscopía de fluorescencia. La citotoxicidad se evaluó en cementoblastos humanos empleando el ensayo de viabilidad celular MTT. **Resultados:** El sellador AH Plus con BisBAL NPs mostró una actividad antimicrobiana mayor (18.7 mm) en comparación con el sellador AH Plus sin suplementar con nanopartículas (10.33 mm), tanto en la cepa de *E. faecalis* como en aislados de pacientes (17.85 mm AH Plus-BisBAL NPs y 10.01 mm AH Plus) (P 0.0001). Se demostró que el sellador AH Plus no posee propiedades antibiofilm, mientras que suplementado con 50 µM BisBAL NPs inhibió por completo la adhesión de *E. faecalis*. La adición de las BisBAL NPs al cemento AH Plus no modificó las propiedades del sellado hasta por 12 días inhibiendo la filtración bacteriana. Finalmente, no se observó aumento en la toxicidad de los cementoblastos humanos cuando se suplementó el sellador AH Plus con BisBAL NPs. **Conclusión:** Los resultados obtenidos sugieren que la suplementación con BisBAL NPs otorga actividad antimicrobiana y antibiofilm significativa sin alterar las propiedades básicas del sellador y viabilidad de cementoblastos humanos.

Palabras clave: Fracaso endodóntico, enterococcus faecalis, nanotecnología, bismuto, AH Plus, bacterias.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF AH PLUS SEALER SUPPLEMENTED WITH BISMUTH LIPOPHILIC NANOPARTICLES ON *Enterococcus faecalis* ATCC MIXTURE CULTURE and *E. faecalis* ISOLATED FROM ROOT CANALS.

Jesús Alejandro Torres Betancourt¹; Claudio Cabral Romero²; Jorge Jaime Flores Treviño¹, Rene Hernández Delgadillo². Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Odontología, Posgrado de Endodoncia¹, Laboratorio de Biología Molecular², alejandro_bt@outlook.es

Introduction: The presence of root canal biofilm has been associated with failure, due to the avoidance of disinfectant agents such as sodium hypochlorite or chlorhexidine, for this reason it is urgent to synthesize new broad-spectrum and low-cost antimicrobial agents for the treatment of multidrug-resistant pathogens. Nanotechnology offers great potential for the treatment of infections caused by microorganisms located in the root canal. **Objective:** Evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of AH Plus sealer supplemented with bismuth nanoparticles (BisBAL NPs) to inhibit the growth of biofilms of *Enterococcus faecalis* ATCC, mixed culture and *E. faecalis* isolated from root canals. **Materials and methods:** The characterization of the AH Plus sealer with BisBAL NPs was carried out by SEM. The antimicrobial activity of the sealer was determined by the disk diffusion test, the antibiofilm activity was analyzed by fluorescence microscopy. Cytotoxicity was evaluated in human cementoblasts using the MTT cell viability assay. **Results:** The AH Plus sealer with BisBAL NPs showed a higher antimicrobial activity (18.7 mm) compared to the conventional sealer (10.33 mm), both in the *E. faecalis* strain and patient isolates (17.85 mm AH Plus-BisBAL NPs and 10.01 mm AH Plus) (P 0.0001). The AH Plus sealer was shown to have no antibiofilm properties, while supplemented with 50 µM BisBAL NPs it completely inhibited the adhesion of *E. faecalis*. The addition of the BisBAL NPs to the AH Plus sealer did not modify the sealing properties for up to 12 days, inhibiting bacterial leakage. Finally, there is no increase in the toxicity of human cementoblasts when AH Plus was supplemented with BisBAL NPs. **Conclusion:** The results obtained suggested that supplementation with BisBAL NPs provides significant antimicrobial and antibiofilm activity without altering the basic properties of the sealer and viability of human cementoblasts.

Keywords: Endodontic failure, enterococcus faecalis, nanotechnology, bismuth, AH Plus, bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

El fracaso del tratamiento endodóntico resulta en una carga financiera para el paciente y frustración tanto para el paciente como para el médico (Chatzopoulos, 2017). La identificación de los factores asociados podría ayudar a los profesionales dentales en la planificación del tratamiento. La causa principal del fracaso del tratamiento, es, como ya se ha mencionado, la presencia de microorganismos aislados como planctónicos o biofilms que quedan en un conducto obturado y pueden filtrarse a los tejidos periapicales. Aunque sabemos que los biofilm intraconducto son complejos, desafortunadamente la literatura no parece ofrecer la debida credibilidad para comprender la dinámica entre los componentes de la misma (Neelakantan, 2017). *Enterococcus faecalis* es un microorganismo predominante que a menudo se aísla de los conductos radiculares infectados (Barbosa, 2016), tiene el potencial de adherirse para formar un biofilm que no puede eliminarse solo por preparación biomecánica. (Singh, 2019 y Bolhari, 2018) Para eliminarlo se emplean irrigaciones con hipoclorito de sodio y clorhexidina, además se utiliza hidróxido de calcio, sin embargo, su actividad antimicrobiana es muy cuestionada sobre todo contra *E. faecalis*. La ausencia de nuevas alternativas para tratar eficazmente a los patógenos multirresistentes es un problema grave de salud pública y es urgente sintetizar nuevos agentes antimicrobianos de tipo no-antibiótico, amplio espectro y bajo costo (Hernández, 2014). Actualmente la nanotecnología ofrece un gran potencial tanto para el diagnóstico, así como para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos (Zhu, 2015). Es urgente desarrollar nuevas alternativas de tratamiento que remuevan e inactiven el biofilm intraconducto. En este estudio se propone evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm del cemento sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs para inhibir el crecimiento y formación del biofilm de *E. faecalis* ATCC 11420, cultivo mixto y *E. faecalis* aislado de conductos radiculares. En caso de ser exitosos se contará con un biomaterial innovador para el tratamiento de las infecciones endodónticas y retratamientos con propiedades sostenidas aún y después de concluir el tratamiento.

2. HIPÓTESIS

La actividad antimicrobiana y antibiofilm del cemento sellador AH Plus fue elevada suplementado con BisBAL NPs para inhibir el crecimiento del biofilm de *E. faecalis* ATCC 11420, cultivo mixto y *E. faecalis* aislado de conductos radiculares.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm del cemento sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs para inhibir el crecimiento del biofilm de *E. faecalis* ATCC 11420, cultivo mixto y *E. faecalis* aislado de conductos radiculares.

3.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un cemento sellador AH Plus suplementado con nanopartículas lipofílicas de bismuto y caracterizarlo por microscopía electrónica de barrido.
- Identificar la presencia de *E. faecalis* en las muestras aisladas de conductos radiculares mediante qPCR.
- Estudiar la actividad antimicrobiana del AH Plus cargado con 50 μM de BisBAL NPs contra *E. faecalis* ATCC 11420, cultivo mixto y *E. faecalis* aislado de conductos radiculares mediante ensayos de difusión en disco.
- Determinar la actividad antibiofilm del AH Plus cargado con 50 μM de BisBAL NPs sobre el biofilm de *E. faecalis* ATCC 11420, cultivo mixto y *E. faecalis* aislado de conductos radiculares mediante microscopía de fluorescencia.
- Examinar la capacidad de sellado en piezas obturadas in vitro en un modelo de cámara dividida.
- Analizar el efecto citotóxico del AH Plus cargado con BisBAL NPs sobre cementoblastos humanos mediante el ensayo de viabilidad celular MTT.

4. ANTECEDENTES

4.1 Obturación del conducto radicular.

El procedimiento final de la terapia endodóntica es lograr una obturación homogénea y tridimensional para evitar la futura filtración apical y coronal, que se traduce en invasión de microorganismos en el sistema del conducto radicular (Schilder, 1967). La obturación tiene la intención de restringir el movimiento de las bacterias sobrevivientes y sus productos fuera del conducto, así como el movimiento inverso de fluidos y nutrientes que lo acompañan (Sundqvist, 1998). Se ha sugerido que cualquier bacteria sobreviviente debe de ser sepultada por medio de la obturación, para minimizar su capacidad de proliferación y liberación de subproductos tóxicos hacia los tejidos perirradiculares del huésped que rodean la raíz (Katebzadeh, 2000). Idealmente, lograr dicho entorno requiere un material de obturación radicular que pueda fluir en todos los espacios del sistema de conductos para crear un sello hermético a los fluidos (Orstravik, 2005), que no se ha demostrado que logre ningún material de obturación (Li, 2014).

4.2 Materiales de obturación

Los requisitos de los materiales de obturación en endodoncia fueron descritos por Grossman en 1988. Estos requisitos son ampliamente aceptados en la actualidad, deben ser: fácil de manipular, amplio tiempo de trabajo, estabilidad dimensional después de su colocación, capaz de sellar los conductos de manera lateral y apical conforme a la anatomía del conducto radicular, no deben ser irritantes para los tejidos periapicales (compatibles con los tejidos), deben ser impermeables a la humedad y no ser porosos, no se deben ver afectados por los fluidos tisulares, así como poseer resistencia a la corrosión y oxidación, bacteriostático o bactericida con radiopacidad que lo haga fácil de discernir en una radiografía, no deben pigmentar o decolorar la estructura dental, deben estar estériles o ser fácil de esterilizar y si es necesario no debe ser complicado retirarlo, entre estas propiedades (Grossman, 1988).

La gutapercha ha sido utilizada para la obturación con un historial muy largo (Xu, 2007). Sin embargo, debido a la pobre adhesividad de la gutapercha, se ha utilizado en conjunto con cementos selladores para lograr este objetivo (Salehrabi, 2004). Independientemente de la técnica utilizada, los cementos selladores son responsables de las principales funciones en la obturación (Orstravik, 2005).

Deben contar con propiedades antimicrobianas y antibiofilm para erradicar el biofilm remanente después de una preparación quimio-mecánica (Kapralos, 2018), además, cumplen una importante función en el control de infecciones endodónticas sepultando las bacterias residuales, así como también previene la filtración de nutrientes (Orstravik, 2005).

Se ha reportado que los selladores recién preparados o durante su fraguado son efectivos para eliminar microorganismos como *Enterococcus Faecalis*, sin embargo, la actividad antimicrobiana disminuye conforme pasa el tiempo (Kapralos, 2018).

Sería ventajoso si los materiales de obturación del conducto radicular tuvieran una sustentividad antimicrobiana para eliminar los microbios residuales que sobreviven al proceso inicial de desinfección del conducto radicular dentro de los túbulos dentinarios o como una biopelícula en superficies dentinarias intactas (Spangberg, 2002).

4.3 Tipos de cementos selladores

Los selladores endodónticos son una parte esencial de la obturación ya que no solo proporcionan un sellado adecuado entre el material del núcleo y las paredes de la dentina, sino que también son antimicrobianos efectivos dentro del sistema de conductos (Ruparel, 2014). Se pueden dividir en los siguientes ocho grupos, de acuerdo con sus componentes principales: Óxido de zinc y eugenol (ZOE), polímeros, hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, siliconas, ionómero de vidrio, cementos como medicación, materiales de adhesión a la dentina y los cementos

biocerámicos. (De Munck et al., 2005). Los más utilizados comúnmente se describen a continuación.

4.3.1 Óxido de zinc

El tipo de sellador más común se basa en cemento de óxido de zinc-eugenol. Los cementos de óxido de zinc-eugenol son generalmente tóxicos. A través de la hidrólisis siempre hay alguna pérdida de eugenol u óxido de zinc. Su efecto antimicrobiano del óxido de zinc tanto en los conos de gutapercha como en muchos selladores será de bajo nivel y larga duración (Spangberg, 2002).

4.3.2 Hidróxido de calcio

La actividad antimicrobiana de los materiales a base de hidróxido de calcio, depende de la liberación de iones hidroxilo causando un aumento en el pH. Un pH superior a 9 puede inactivar de manera reversible o irreversible las enzimas de la membrana celular del microorganismo, lo que resulta en una pérdida de actividad biológica de la membrana citoplasmática (Estrela, 1995).

4.3.3 Biocerámicos

Se basan químicamente en silicatos de calcio, fosfato de calcio y óxido de calcio (Hes, 2011). Su capacidad antibacteriana de larga duración puede deberse al sílice disuelto en un ambiente de pH alto ya que inhibe directamente la viabilidad bacteriana (Zehnder, 2006). Además, por la difusión continua de hidróxido de calcio expandido en los túbulos dentinarios lo cual puede explicar la muerte continua de bacterias durante el período de 30 días. (Heling, 1996).

4.3.4 Polímeros

Los cementos basados en polímeros se usan comúnmente en endodoncia. Estos se encuentran en la categoría de los selladores a base de resina epóxica como

el AH 26 y AH Plus (Dentsply, Konstanz, Alemania). AH 26 fue desarrollado por Schroeder en 1957 para su uso como cemento con un núcleo de gutapercha, o como una pasta de obturación radicular (Cohen, 1998). La formulación original del cemento de resina AH 26 se modificó en los últimos años para reducir la citotoxicidad. Dando como resultado a su más reciente presentación nombrada AH Plus (Huang, 2002). AH26 y AH Plus son tóxicos cuando están recién preparados. Esta toxicidad disminuye rápidamente durante el fraguado, y después de 24 h los cementos tienen uno de los niveles más bajos de toxicidad de los selladores endodónticos (Spangberg 2002). Esta toxicidad se atribuye a la liberación de una cantidad muy pequeña de formaldehído como resultado de una reacción química en el momento del fraguado. Además, el bisfenol liberado durante el fraguado se identificó como un agente mutagénico (Heil et al., 1996). El efecto antimicrobiano de AH Plus puede estar relacionado con la liberación de bisfenol-A diglicidil éter en los túbulos dentinarios durante el proceso de polimerización (Slutzky, 2008).

4.4 Propiedades ideales de un cemento sellador

4.4.1 Efectos antimicrobianos y antibiofilm

Los cementos selladores han incorporado componentes antimicrobianos para evitar el rebrote de bacterias residuales, y se han informado diferentes efectos inhibitorios para varios tipos de selladores. Eugenol, óxido de zinc, timol, hexametilentetramina, óxido de calcio, bisfenol-A diglicidil éter y paraformaldehído son algunos de ellos. Estos deben liberarse de la matriz del sellador para que sean efectivos. Sin embargo, se ha informado que pueden exhibir efectos tóxicos en los tejidos del huésped debido a la falta de toxicidad selectiva contra los microorganismos (AlShwaimi, 2016).

Un estudio realizado en 2018 evaluó la actividad antimicrobiana y antibiofilm de AH Plus, TotalFill BC sealer, RoekoSeal y Guttaflow 2, indicó que la actividad antimicrobiana del cemento AH Plus era mayor que la de otros cementos en todas

las especies bacterianas evaluadas tanto en su estructura tridimensional (biofilm) como en estado planctónico, sin embargo, su actividad es solo por 24 horas posteriores a la obturación (Kapralos, 2018).

4.4.2 Biocompatibilidad

El éxito del tratamiento solo puede lograrse si el material de obturación es biocompatible y crea un sello biológico en la región periapical. La biocompatibilidad es una de las propiedades más importantes que deben presentar los selladores endodónticos, ya que estarán en contacto cercano con los tejidos periapicales (Cintra, 2017). Los selladores pueden extruirse en el tejido perirradicular cuando se compacta el material del núcleo de obturación. Por lo tanto, la extrusión del sellador puede estimular una respuesta inflamatoria y activar las neuronas sensoriales, tal vez causando dolor persistente después de la terapia endodóntica. (Ruparel, 2014).

4.5 Cemento AH Plus

Este sellador ha sido ampliamente utilizado con frecuencia para comparar debido a sus buenas características fisicoquímicas y su adaptabilidad a las paredes del conducto radicular (Marciano, 2011). Cuenta con alta compatibilidad tisular, baja solubilidad y un tiempo de fraguado relativamente corto (Guinesi, 2014). En vista de estas características, AH Plus se considera actualmente como el sellador endodóntico estándar de referencia clínica (Keles, 2014). Es un sellador de resina epoxi de uso común que se dispensa en 2 pastas. (Sarkar, 2005).

Pasta A (Ámbar)	Pasta B (Blanco)
Resina epóxica de bisfenol A	Dibenzil-diamina
Resina epóxica de bisfenol B	Aminoadamantano
Tungsteno de calcio	Tungsteno de calcio
Sílice	Óxido de zirconio
Óxido de hierro	Sílice
	Aceite de silicona

Tabla #1. Composición química del cemento sellador AH Plus (Cohen, 2011).

4.6 Fracaso endodóntico

El tratamiento endodóntico es un procedimiento razonablemente predecible con tasas de éxito de entre 86% y 98%. El éxito o el fracaso de este tratamiento se evalúan por los signos y síntomas clínicos, así como por los hallazgos radiológicos del diente tratado. Los síntomas y signos clínicos que definen el éxito son: la ausencia de dolor, la desaparición de la inflamación y las fístulas, si existían antes del tratamiento, así como el mantenimiento del diente funcional y firme en su alveolo. Radiográficamente, la curación completa de la lesión ósea periapical existente y la apariencia normal de la lámina dura durante un período de 6 meses a 24 meses, definirán el éxito. Histológicamente, sin embargo, debe producirse una reparación completa de las estructuras periapicales con ausencia de células inflamatorias (Tabassum, 2016).

La causa principal de las infecciones endodónticas, y por lo tanto también del fracaso del tratamiento, es, como ya se ha mencionado, la presencia de microorganismos aislados como planctónicos o biofilms (Ricucci, 2010).

Estudios recientes informaron una tasa de éxito del 95% después del tratamiento convencional del conducto radicular en casos de pulpitis irreversible. El 85% de los dientes con pulpa necrótica fueron tratados con éxito utilizando un tratamiento endodóntico no quirúrgico. Sin embargo, la tasa de éxito del retratamiento no quirúrgico es notablemente menor, con un 74% (Yoon, 2018).

Normalmente, los factores etiológicos en el fracaso del tratamiento endodóntico se pueden ubicar en 4 grupos: microorganismos intrarradiculares persistentes o reintroducidos, infección extrarradicular en la cual se forma una biopelícula en la superficie de la raíz externa que rodea los agujeros apicales (Ricucci, 2015; Hinrichs, 2015), reacción de cuerpo extraño y quistes verdaderos. (Sundqvist, 1998). Entre ellos, muchos estudios informaron que los microorganismos en los conductos radiculares o las lesiones perirradiculares juegan un papel importante en la persistencia de las lesiones de periodontitis apical después de un tratamiento del conducto radicular (Gomes, 2008).

El rol de las bacterias creciendo en biofilms intraconducto, túbulos dentinarios y ramificaciones han sido asociadas a fracaso del tratamiento endodóntico debido probablemente a la evasión de los desinfectantes (hipoclorito de sodio o clorhexidina) (Maurer, 2011), o a un tiempo muy corto de exposición a estos (Mohammadi, 2013).

En un estudio realizado en Corea en 2011 se evaluaron 557 casos que requerían cirugía apical por fracaso del tratamiento endodóntico y arrojó como resultados que la mayor causa de fracaso es la filtración microbiana del conducto radicular con un 30.4%, seguido de conductos no encontrados con un 19.7% (Minju y Hyeon, 2011).

4.6.1 Infecciones persistentes

Se cree que la persistencia de microorganismos dentro del sistema de conductos radiculares después del tratamiento endodóntico es la mayor causa de fracaso (Alves, 2016). La periodontitis apical posterior al tratamiento puede clasificarse como persistente (persistente a pesar del tratamiento), emergente (apareció después del tratamiento) o recurrente (reconstruida después de haberse curado) (Siqueira, 2011). Posiblemente, la enfermedad persistente es causada por una infección intraconducto con bacterias que sobreviven a los efectos del tratamiento, mientras que la enfermedad emergente es causada por una infección secundaria (contaminación durante el tratamiento o filtración coronal después del tratamiento) (Siqueira, 2009). La enfermedad recurrente a menudo representa un fracaso tardío del tratamiento endodóntico, y la causa está supuestamente relacionada con un nuevo evento que surge años después de la conclusión del tratamiento (por ejemplo, una infección secundaria debido a una filtración coronal o fractura de raíz) (Ricucci, 2011). Sin embargo, una infección persistente también podría desempeñar un papel en causar la recurrencia de la enfermedad, siempre que las bacterias residuales logren sobrevivir en el conducto durante años después del tratamiento y, en respuesta a los cambios ambientales, puedan verse favorecidas, prosperando nuevamente y reactivando

la infección. Las bacterias que causan infecciones persistentes generalmente se encuentran en áreas no afectadas por instrumentos y sustancias antimicrobianas, incluidos los conductos laterales, las ramificaciones apicales y los istmos (Ricucci, 2010). Además, las bacterias pueden permanecer incluso en el conducto principal, especialmente en las paredes del conducto dentinario que no han sido tocadas por los instrumentos (Alves y Versiani, 2011).

Por otra parte, se ha informado que la infección del túbulo dentinario ocurre en 70% a 80% de los dientes con periodontitis apical primaria (Matsuo, 2003).

Aunque una penetración intratubular superficial es más común, las células bacterianas pueden alcanzar hasta 300 mm de profundidad en algunos dientes (Siqueira, 2002). Debido a que algunas células bacterianas dentro de los túbulos se han observado aparentemente en proliferación activa (Siqueira, 2002) hay razones para creer que los nutrientes están disponibles en estas áreas. Los procesos odontoblásticos degradantes, el colágeno desnaturalizado, las células bacterianas que mueren durante el curso de la infección y los fluidos intraconducto que ingresan a los túbulos por capilaridad pueden servir como fuentes de nutrientes para las bacterias intratubulares. Se ha demostrado que varios agentes patógenos endodónticos putativos pueden penetrar y colonizar los túbulos dentinarios (Love 2002, Matsuo 2003, Peters 2001, Waltimo 2000, Siqueira 2002, Siqueira 1996, Pérez 1993). Las células bacterianas que invaden los túbulos dentinarios son definitivamente más difíciles o incluso imposibles de alcanzar durante el tratamiento.

4.6.2 *Enterococcus Faecalis*

Thiercelin había acuñado el término *Enterococcus* a fines del siglo XIX una vez que representó una bacteria saprófita de origen orgánico interno que era de naturaleza infecciosa (Lebreton, 2014). *Enterococcus faecalis* se ha convertido en un agente infeccioso humano muy importante debido al aumento dentro del rango de infecciones causadas por este organismo y la aparición de cepas multirresistentes a fármacos. Los *enterococcus* son cocos grampositivos

anaerobios facultativos y tienen el potencial de causar enfermedades graves y, con frecuencia, potencialmente mortales en los seres humanos, incluidas infecciones del tracto urinario, infecciones intraabdominales, bacteriemia y endocarditis. (Singh, 2019).

Enterococcus faecalis puede adherirse a estructuras extracelulares y puede formar biofilm, que es uno de los procesos más importantes en la infección y colonización en el huésped. La virulencia de *Enterococcus faecalis* se debe principalmente a varios factores secretados además de las propiedades localizadas en la superficie. Estos factores de virulencia pueden desempeñar un papel importante en la adherencia de *Enterococcus faecalis* a los tejidos del huésped, su invasividad y la formación de abscesos, así como la secreción de diferentes productos que mejoran la formación de biopelículas. También pueden afectar las respuestas inflamatorias del huésped. Dentro de los factores de virulencia se incluyen; sustancia de agregación (AS), serina proteasa (sprE), antígeno de polisacárido enterocócico (epa), gelatinasa (gelE), proteína de superficie enterocócica (esp) y proteína de estrés general (gls24); sin embargo, gelE, sprE y esp no se han encontrado sistemáticamente en aislamientos clínicos. El antígeno de endocarditis por *Enterococcus faecalis* (efaA) es un factor de virulencia muy potente que se puede encontrar en cepas de *Enterococcus faecalis* detectadas en los conductos radiculares de infecciones endodónticas resistentes al tratamiento y se identificó por primera vez desde el antisuero de un paciente con endocarditis por faecalis (Bolhari, 2018).

Los componentes de la pared celular, como los carbohidratos y los ácidos teicoicos, también son factores de virulencia que funcionan al superar varias defensas del huésped (Weidenmaier, 2008). A su vez, se informó que *Enterococcus* tiene elementos genéticos móviles (MGE) que incluyen plásmidos y transposones responsables del aumento de la resistencia antimicrobiana (Raven, 2016).

Otro de sus factores de virulencia es la secreción la citolisina, un miembro de la categoría lantibiótica de bacteriocinas (Van Tyne, 2013).

Es reconocida como la tercera causa principal de endocarditis infecciosa (EI) en todo el mundo (Pericas, 2017).

En el campo de la endodoncia y es la especie más prevalente aislada de los conductos radiculares de los dientes previamente obturados con periodontitis apical crónica, afectada hasta en un 77% de los casos (Carbajal, 2013).

4.6.3 Biofilms humanos

Las biopelículas son estructuras altamente organizadas de células bacterianas envueltas en una matriz polimérica extracelular unida a una superficie (Flemming, 2016).

Las propiedades de las bacterias dentro de un biofilm son diferentes a las de las células planctónicas, en parte porque los microorganismos de estas primeras están protegidos del estrés ambiental gracias a su matriz (Caggianiello, 2016). Esta matriz ofrece protección a cambios de pH, shock osmótico, radiación ultravioleta y desecación (Flemming, 2016). Además, proporciona una barrera física estructural y protectora contra las malas condiciones de vida como el sistema de defensa del huésped (Abdelhady, 2014). Una subpoblación conocida como persistentes a menudo se encuentra dentro de la comunidad de biopelículas. Estas persistencias pueden pertenecer a cualquier tipo de bacteria y se encuentran en un estado fenotípico altamente resistente a la muerte por muchos agentes antimicrobianos (Kaldalu y Zhao, 2016).

Se han propuesto tres mecanismos por los cuales los biofilms contribuyen a la resistencia. Primero, se ha postulado que las células bacterianas embebidas en matrices de polisacáridos que constituyen el biofilm son menos accesibles a la difusión del antibiótico (Anderl, 2000). La segunda razón es que se trata de una forma indiferenciada del fármaco a causa de los nutrientes y otros limitantes, pues muchas células bacterianas dentro del biofilm no se replican ni metabolizan lo suficiente para que el antibiótico funcione de manera eficaz (Anderl, 2003). La tercera hipótesis, y actualmente la más apoyada, es que las bacterias dentro de

los biofilms se diferencian a estados refractarios a los antibióticos; es decir, una combinación de indiferencia y persistencia al fármaco (Southey-Pillig, 2005).

Por otra parte, las bacterias dentro de una biopelícula pueden tolerar altas dosis de antibióticos y sustancias antimicrobianas (Graziano, 2015). El uso de fármacos de larga duración permite que los microorganismos expresen genes que les otorgue resistencia haciéndolo ineficaz (Barbosa, 2016).

Otra de sus características es que, mediante el uso de moléculas de señalización química, las bacterias pueden comunicarse entre sí. El quorum sensing permite a las bacterias monitorear el ambiente en busca de otras bacterias y permite alterar el comportamiento de uno a escala de toda la población (Mangwani, 2016). Estudios de susceptibilidad han demostrado que las bacterias son 1,000 veces más resistentes a tratamientos antibióticos cuando la biopelícula se ha formado (Dong, 2015).

La apreciación de las bacterias que viven en biopelículas de múltiples especies en lugar de en comunidades de monoespecies, o en un estado de vida libre, ha cambiado la forma en que se estudian las bacterias en el laboratorio. Se están creando modelos para replicar entornos de biopelículas (Lebeaux, 2013), ingresando así a tiempos de reaprendizaje del comportamiento bacteriano a medida que viven y sobreviven en biopelículas.

Una biopelícula muy común es la placa dental, iniciada por *Streptococcus* spp. Incluyendo *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. sanguinis* y *S. oralis*. (Jenkinson, 1994). Debido a los avances en tecnología y biología computacional, es posible estudiar la expresión de genes y proteínas en tales comunidades, revelando así el papel que cada especie tiene en esa comunidad específica (Qayyum, 2016).

4.6.4 Biofilm endodóntico

La formación del biofilm intraconducto es probablemente iniciado después de la infección a la cámara pulpar por microorganismos plantónicos después de la ruptura del tejido (Svensater, 2004). El desarrollo de biopelículas incluye 5

etapas: fijación primaria (fijación reversible), fijación irreversible, formación de microcolonias, desarrollo y maduración de la biopelícula, y el despolímero final (Chen, 2016). Esto llama la atención sobre la dispersión de la biopelícula, durante la cual, la actividad metabólica de las células cambia a un estado inactivo (D'Acunto et al. 2019). Las características de los biofilms están influenciadas por las interacciones complejas entre los organismos componentes en una amplia variedad de entornos ambientales, incluida la nutrición, la naturaleza del sustrato, las moléculas de detección de quórum, los factores de virulencia y metabolitos secundarios (Roder et al. 2016, Gao et al. 2016). Microorganismos como el estafilococo aureus (Gram +), *P. aeruginosa* (Gram-) y *C. albicans* colonizan comúnmente la cavidad oral humana, donde producen biofilms en superficies bióticas y abióticas. Además, dichos microorganismos se consideran entre las especies más resistentes detectables en los conductos radiculares infectados, por lo que a menudo se asocian con fallas en el tratamiento endodóntico. (Meto, 2019). Se han observado biopelículas bacterianas de grosor variable en la mayoría de las paredes del conducto radicular, a veces llenando completamente la luz. (Ricucci, 2017).

4.7 Métodos para estudiar el biofilm endodóntico.

Placas de microtitulación, microscopia confocal laser, microscopia de fluorescencia, SEM. La mayoría de los modelos para formar y estudiar biofilm han sido desarrollados para usar el flujo de nutrientes sobre una superficie donde las bacterias puedan ser fijadas. Otros utilizan el método estático como discos de hidroxiapatita o esmalte inmerso en medio de cultivo utilizando ligeros movimientos sobre placas de poliestireno, mica o vidrio sumergidos en el medio de cultivo inoculado con la bacteria. Los reactores de flujo continuo fueron desarrollados para crecer biofilms dentro de flujo laminar lento y fueron validados en el 2009. Se han realizado varias modificaciones para que el modelo de biofilm de flujo continuo se pueda aplicar intraconducto, permitiendo así la formación de biofilm en la superficie de la dentina y se pueda explorar de manera reproducible tal como sucedería en la vida real del paciente (Neelakantan, 2017).

4.8 Bismuto

El bismuto es un metal que pertenece al grupo 15 de la tabla periódica junto con arsénico, antimonio, fósforo y nitrógeno. Posee un número atómico de 83 y masa atómica de 209, presenta dos estados de oxidación; +3 y +5, siendo el +3 el más estable (Kirk, 1998). México es el segundo productor más importante de bismuto a nivel mundial, después de China. Ha sido utilizado para diversas aplicaciones que incluyen; cosmética, balas, soldadura, aleaciones, síntesis de compuestos orgánicos, etc. En el área médica el bismuto fue utilizado por primera vez por Louis Odier en 1786 para tratar la dispepsia. Actualmente se utiliza en medicamentos tales como; *Pepto Bismol* para malestar estomacal y diarrea, *Synalar rectal* para el tratamiento de hemorroides, *Labcatol* para afecciones del tracto respiratorio y *Gastronedol* como gastroprotector.

El bismuto sus compuestos no son cancerígenos, son menos bioacumulables y tóxicos en comparación con elementos como el arsénico, antimonio o plomo (Hernández, 2013). Se estima que, para un adulto de 70 kg de peso, la dosis letal de bismuto sería de alrededor de 15 g. Los compuestos de bismuto son poco absorbidos y por lo tanto son considerados de baja toxicidad. Una vez que es absorbido, el bismuto es transportado a través del suero por la transferrina y excretado por vía urinaria. Los aspectos toxicológicos del bismuto y sus compuestos son bien conocidos y después de consumir dosis altas por más de 14 días se puede presentar; nefropatía, hepatitis, encefalitis, gastroenteritis y osteoartrosis (Karahan, 2013).

4.9 Nanotecnología

El desarrollo de alternativas de amplio espectro para tratar eficazmente los microorganismos patógenos resistentes a múltiples fármacos es un enfoque de investigación en curso para reducir nuestra dependencia a los antibióticos. Una de esas opciones es la nanotecnología, que ofrece un gran potencial para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades (Linkov, 2008).

La nanotecnología es la ciencia que trata con partículas pequeñas, con tamaños de milésimas de millón de metro, a esa escala los materiales o componentes químicos, muestran propiedades y aplicaciones que no siempre muestran a escalas mayores y pueden ser aplicados a muchas ciencias y disciplinas (Shelley, 2006), algunas de estas disciplinas están en vínculo directo con la vida, como lo es la biomedicina, en donde este tipo de tecnología se aplica para resolver problemas en cuestión de formulación de materiales, máquinas de biotecnología y máquinas de sistemas moleculares (Seifalian, et al., 2014).

Una de las aplicaciones de esta tecnología, se expuso en el tercer encuentro de nanotecnología en medicina, en la cual se menciona la producción de medicamentos basados en nanotecnología, los cuales se administran por uno métodos más estudiados en los últimos años, la emergente terapia inhalada, en donde por medio de humidificadores, se amplifican y reciben estos medicamentos (Azzawi, et al., 2016). Así mismo mencionan una tecnología a base de nanopartículas de oro que pueden, no solo diagnosticar cáncer a través de una T.C., si no que puede entregar tratamiento específico en la zona afectada, con mínimo daño al huésped, esta tecnología aún está en proceso de investigación, pero promete una terapia segura para el tratamiento de esta enfermedad que ha tenido un aumento de incidencia en los últimos años (Karponis, et al., 2016).

Algo que llama particularmente la atención de las nanopartículas es la diferencia de propiedades químicas y físicas con respecto a los macrocristales. Estas diferencias han obligado a retomar la investigación de muchos compuestos simples que creíamos conocer a la perfección (Poole y Owens 2003; Elaissari 2008).

4.10 Nanotecnología en Odontología

La nanotecnología está muy involucrada hoy en día en la odontología, desde la producción de materiales dentales, hasta el uso de nanopartículas como métodos de estudio de estructuras dentales.

Las nanopartículas (Np) son partículas ultrafinas de componentes insolubles con un diámetro inferior a 100 nm (DaSilva, 2013). En la última década, han abierto nuevas posibilidades y un interés significativo en la atención de la salud, principalmente debido a sus características químicas, biológicas y antibacterianas de amplio espectro (Kishen, 2008).

Se ha intentado implementar la nanotecnología en materiales de uso cotidiano en la odontología, como son el Ionómero de vidrio, al cual se la ha modificado con nanopartículas cerámicas, con el objetivo de disminuir el desgaste de este material, ya que en su fórmula original, resulta un material óptimo para la restauración dental por su alta afinidad a la dentina y su constante liberación de fluoruro, pero tiene un desgaste mayor al de la resina, amalgama o el mismo diente (Najeeb et al., 2016). Otra aplicación en materiales dentales, es en resinas con nanopartículas cerámicas no previamente recubiertas con sílice, estas ahora modificadas con sílice con el fin de proporcionar una mejor adhesión al polimerizar después de ser silanizadas (Kaizer et al., 2016; Rezvani, et al., 2016).

Dentro de los campos más estudiados en la odontología esta la osteointegración de los implantes, actualmente existen estudios que demuestran que el uso de la nanotecnología, en forma de recubrimientos de implantes como el de nano-hidroxiapatita o nanopartículas de fosfato de calcio en diferentes concentraciones (Jimbo et al., 2012) permiten una osteointegración más uniforme, densa y estable que en la colocación de implantes sin nanopartículas adicionadas. Inclusive, implantes tratados con nanopartículas de fibrina de seda, que no solo inducen a la osteointegración, sino que también liberan por un tiempo prolongado un efecto antibacterial, proporcionando un espacio libre de bacterias para la correcta osteointegración del implante (Sharma et al., 2016).

4.11 Nanopartículas de bismuto

Actualmente la nanotecnología ofrece un gran potencial tanto para el diagnóstico, así como para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos (Zhu, 2015). La ausencia de nuevas alternativas para tratar

eficazmente a los patógenos multirresistentes es un problema grave de salud pública y es urgente sintetizar nuevos agentes antimicrobianos de tipo no-antibiótico, amplio espectro y bajo costo. El área de la terapia basada en nanopartículas recibe una atención particular para revolucionar el tratamiento médico con terapias "inteligentes" que son simultáneamente más potentes con menos efectos secundarios. Parecen ser tan buenas como los antibióticos para matar las bacterias planctónicas, y más efectivas para inhibir la formación de biopelículas de microorganismos patógenos (Hernández, 2014). Recientemente se describieron las propiedades antimicrobianas de nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBAL NP's) sobre patógenos orales inhibiendo la formación de su biofilm, obteniendo una concentración mínima inhibitoria de 5 μM , valor que compite con los antibióticos más comúnmente empleados (Cabral, 2012). Estudios previos han evidenciado el potencial de inhibición de crecimiento bacteriano de las nanopartículas de BisBAL contra *S. mutans*, *S. gordonii* y *Lactobacillus casei* (Mosmann, 1983) y *C albicans* (Hernández, 2014) con ensayos MTT, Así como también su eficacia antibiofilm mediante microscopia de fluorescencia (Yue, 2001). Recientemente nuestro grupo de trabajo y otros hemos descrito que las nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBAL NP's) se liberan lentamente, lo que induce una actividad antimicrobiana in situ persistente durante periodos de tiempo prolongado superando el efecto de fármacos como clorhexidina, nistatina y terbinafina para controlar el crecimiento y formación de biopelículas de *S. Mutans* y *C. Albicans* (Hernández, 2013). Además, las BisBAL NP's fueron capaces de inhibir rápidamente la formación del biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (Shakibaie, 2019) mostrando así su alta capacidad para actuar sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas. De igual manera hemos descrito que la adición de BisBAL NP's a cultivos de células epiteliales o sanguíneas humanas no causa citotoxicidad a las 24 y 48 horas de exposición (Hernández, 2016). Un estudio realizado en el año 2014 determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las nanopartículas de BisBAL, la concentración más baja de NP'S de BisBAL analizados (0.1 μM) disminuyó el crecimiento bacteriano en más del 70% en comparación con 1.2 mM de

clorhexidina, lo que disminuyó el crecimiento solo en un 50%, lo que sugiere su mayor potencial para inhibir el crecimiento microbiano. El mecanismo antimicrobiano de BisBAL NP's aún no está completamente determinado. Según su naturaleza lipofílica, es posible que puedan interactuar con la membrana plasmática de los microorganismos, alterando su permeabilidad y causando lisis celular. Una vez dentro de la célula, los BisBAL NP'S pueden modificar la expresión de proteínas o dañar el ADN genómico (Hernández, 2014). Al evaluar su efectividad antibiofilm, se obtuvo como resultado una inhibición casi completa en cultivos mixtos de *S. mutans*, *L. casei*, *S. gordonii* y *C. albicans* a concentraciones de 100 μ M desde la hora 0 (Hernández, 2014). Parecen ser agentes antimicrobianos más efectivos con MIC más bajas que iones o nanopartículas de plata (Badireddy, 2013).

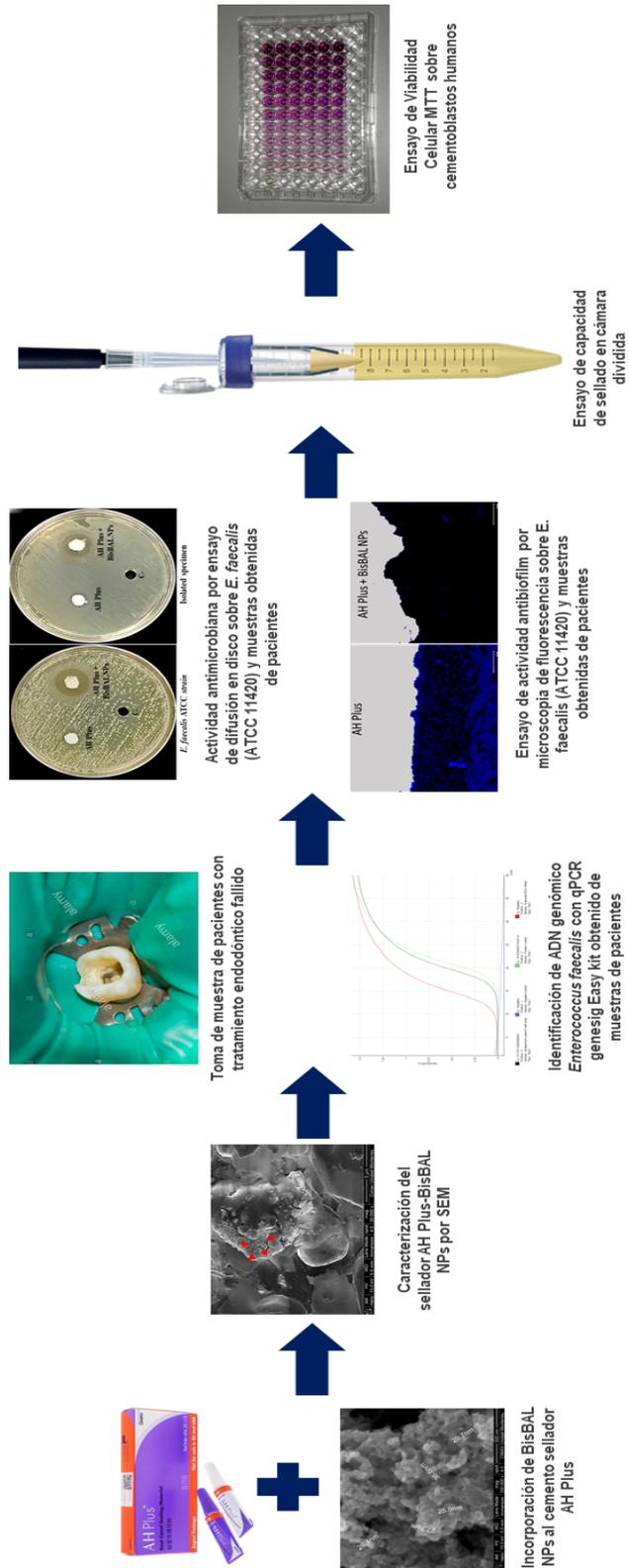
4.12 Suplementación de cemento sellador AH Plus

En diferentes estudios se ha evaluado el uso y suplementación de diferentes componentes al cemento sellador AH Plus, muchos de ellos se enfocan en la efectividad antimicrobiana, algunos en toxicidad y otros más en la alteración de las propiedades físicas originales del cemento. En 2017 se incorporó nanopartículas de plata al cemento AH Plus y se examinó su actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* por difusión en disco, en sus resultados obtuvieron halos de inhibición de máximo 8.69 mm (Teixeira A, et. al. 2017), En otro estudio publicado en el 2020 establecieron la toxicidad de AH Plus + AgVO₃ frente a fibroblastos gingivales humanos revelando un aumento significativo en la toxicidad al ser suplementado con un porcentaje de viabilidad celular de 34% a las 24 horas y 2% a los 7 días (Teixeira A, et. al. 2020).

Otro nanomaterial utilizado con el mismo propósito es el quitosano, en 2019 se probó su efectividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* por ensayo de contacto directo, mientras que el cemento AH Plus convencional arrojó resultados de 7.7 mm, al ser suplementado su actividad aumento, no de forma significativa a 8.5 mm (Loyola, et. al. 2019).

La actividad antibiofilm se ha probado con AH Plus suplementado con nanopartículas de quitosano, mediante microscopia confocal laser determinaron un daño significativo a la membrana bacteriana y disrupción bacteriana con disminución del grosor del biofilm (Loyola et al, 2019). También se ha empleado el uso de nanopartículas de polietilenoimina de amonio cuaternario mediante ensayo de microplacas con cristal violeta, se encontró una diferencia significativa al suplementar AH Plus con las nanopartículas (Barros et al, 2014).

5. MATERIAL Y METODOS



Resumen gráfico de la metodología empleada.

5.1 Cultivo microbiano.

Para el crecimiento de *Enterococcus faecalis* (ATCC; 11420), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC; 53978), *Candida Albicans* (ATCC; 90029), *Streptococcus gordonii* (ATCC; 10558), *Streptococcus mutans* (ATCC; 700611), *Streptococcus sobrinus* (ATCC; 27607), se cultivaron en medio de tripticaseína de soya (TSB, BD DIFCO, Sparks MD, EE. UU.) A 37°C durante 24 horas en condiciones aeróbicas. Se emplearon microorganismos en fase exponencial para evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm.

5.2 Obtención de microorganismos aislados de pacientes.

La metodología del presente trabajo fue aprobada por el comité de bioética. A todos los pacientes que participaron en este estudio se les entregó un consentimiento informado. Se tomaron muestras de pacientes adultos con tratamiento endodóntico fallido, dichos aislados son una representación de los patógenos constitutivos del biofilm endodóntico.

Se realizó la recolección de muestras de 50 dientes humanos que cumplieron con los siguientes requisitos: Piezas unirradiculares o multirradiculares, integra, con diagnóstico de pieza previamente tratada y ápice cerrado. Todas las muestras fueron analizadas radiográficamente, se excluyeron aquella que presentaron reabsorción radicular, conductos calcificados, fracturas, ápices abiertos, diagnóstico pulpar diferente a pieza previamente tratada, pacientes bajo tratamiento médico sistémico, piezas con poste.

Tal como lo realizaba el Dr. Siqueira, los dientes fueron aislados con dos diques de hule, se desinfectó la zona de trabajo con peróxido de hidrógeno al 30% y luego se colocó Isodine al 5%, se retiró el tejido carioso o restauraciones defectuosas con una fresa de carburo de bola #2, de tallo largo, posteriormente se retiró el primer dique y se utilizaron limas manuales tipo Hedstrom sin solventes para la remoción de gutapercha contaminada. Al eliminar la gutapercha, se colocó solución salina en el conducto, se realizó un limado con una lima #15 tipo K para extraer una muestra de tejido dentinario, realizando movimientos de cepillado a 1 mm menor de su longitud de trabajo, sumado a ello

se colocaron dos puntas de papel estériles para recolectar el tejido desprendido con el limado, el mango de la lima fue separado del vástago y la parte activa mediante unos alicates para evitar la contaminación del material, se colocó junto con las dos puntas de papel en un tubo Eppendorf con tripticaseína de soya y se incubó por 7 días a 37°C.

5.3 Síntesis de nanopartículas de BisBAL.

Para la síntesis de nanoestructuras de bismuto, en base a los estudios previos (Hernández, et. al. 2017) se utilizaron los siguientes reactivos químicos: bismuto pentahidratado $[\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$, 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL), borohidruro de sodio (NaBH_4), y propilenglicol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Agua ultrapura (Barnstead Nanopure Diamond) fue utilizada para preparar soluciones y diluciones. Una solución concentrada de Bi^{3+} 50 mM fue preparada al disolver $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de propilenglicol calentado a 80°C y bien mezclado por 2 horas. Una relación molar 2:1 de Bi (Bis) a 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) fue preparada al añadir 25 μl de BAL 10M a 10 ml de Bi^{3+} 50 mM. Una solución concentrada de nanopartículas BisBAL 25 mM fue preparada al diluir 5 ml de BISBAL 50mM en 4.25 ml de agua ultrapura fría al añadir la solución recién preparada de borohidruro de sodio (NaBH_4 75mM), colocando 0.75 ml y mezclando vigorosamente. Durante el curso de esta reacción, el color rosa de la solución soluble BisBAL se transformó en una suspensión oscura compuesta de nanopartículas de BisBAL (Badireddy, 2014).

5.4 Caracterización de nanopartículas de BisBAL.

La distribución de nanopartículas fue medida por DLS (Dispersión de Luz Dinámica, ALV-GmbH, ángulo de dispersión a 90°). Información sobre la forma y tamaño de las nanopartículas se obtuvo mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM; FEI XL30 SEM-FEG, Hillsboro, OR). Las muestras para SEM fueron preparadas como sigue: una gota de nanopartículas fue capturada por una rejilla de cobre y se dejó evaporar antes de obtener la imagen en un acelerador de voltaje de 160 kV. Espectro de luz UV-Vis de una suspensión de 2 ml de BisBAL NP's fue obtenido por un espectrofotómetro (SpectraMax

Plus384 Absorbance Microplate Reader, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA). Difractómetro de rayos X (XRD: Panalytical X'Pert PRO MRD) equipado con Cu K α como fuente de rayos X ($\lambda = 1.541874 \text{ \AA}$) fue usado para determinar el tamaño cristalizado de la nanopartícula e identificar la fase romboédrica. Patrones XRD fueron obtenidos dejando secar al aire las BisBAL NP's después de evaporar el agua de la solución de NP's (centrifugando tres veces a 16, 100 g por 30 segundos en cada ocasión) depositada varias veces sobre un portaobjetos toda la noche.

5.5 Desarrollo del cemento sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs.

Partiendo de nanopartículas previamente sintetizadas en el laboratorio, realizamos la suplementación al cemento sellador AH Plus (Dentsply International Inc, York, PA) en su fase líquida respetando las proporciones del fabricante, se suplementó con 50 μM de BisBAL NPs al cemento sellador AH Plus y se dejó secar al aire libre. Todos los experimentos fueron realizados con el mismo lote del producto y fueron realizados por triplicado para asegurar la veracidad de los resultados.

5.6 Caracterización del cemento sellador AH Plus-BisBAL NPs por microscopía electrónica de barrido.

El cemento sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs fue analizado con el objetivo de asegurar la presencia y distribución de las nanopartículas de bismuto, para lo que se empleó microscopía electrónica de barrido (SEM; FEI Tecnai G2 Twin, Hillsboro, OR; 160 kV accelerating voltage). La composición elemental química fue determinada por espectro EDS, análisis micro ($1\mu^3$) sobre varios puntos fue desarrollada sobre la muestra de cemento-sellador con nanopartículas.

5.7 Detección de *Enterococcus faecalis* en muestras obtenidas mediante PCR en tiempo real (qPCR).

Para determinar la presencia específica de *E. faecalis* en las muestras clínicas humanas, se utilizó el kit genesig Easy kit para *Enterococcus faecalis* (Primer Design, Reino Unido) (Pradeep, et. al. 2017) y PCR en tiempo real. El ADN genómico se extrajo del aislamiento clínico empleando el kit de ADN genómico Isolate II (Bioline, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del proveedor. La mezcla de reacción estaba en un volumen final de 20 μ l con 5 μ l del ADN extraído o agua estéril como control negativo. La amplificación se desarrolló en The genesig q16 (Primer Design, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del kit genesig Easy kit para *Enterococcus faecalis* (Williams, et. al. 2006).

5.8 Actividad antimicrobiana del AH Plus-BisBAL NPs.

Para determinar si la adición de las nanoestructuras de bismuto realmente le confería propiedades antimicrobianas al cemento sellador AH Plus, se empleó el ensayo de difusión en disco (Tsaur, et. al. 1993). *Enterococcus faecalis* (ATCC no's. BAA-308), el cultivo mixto y *E. faecalis* aislado de muestras de conductos radiculares, fueron cultivadas en Trypticaseína de soya (TSB, BD DIFCO, Sparks MD, USA) a 37°C, durante 18 horas en condiciones aeróbicas con inóculos estándar (0.5 McFarland). 100 μ L del cultivo bacteriano fue esparcido en placas Petri con agar TSB empleando un hisopo de algodón estéril. Luego se perforó el agar con anillos de poliestireno para generar pozos de 5mm de diámetro. Los grupos de AH Plus con 50 μ M de BisBAL NPs fueron incrustados en los pozos de agar y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano mediante el uso de un Vernier. Los ensayos se realizaron por triplicado para asegurar la veracidad de los resultados.

5.9 Actividad antibiofilm del AH Plus-BisBAL NPs.

Basados en el protocolo descrito previamente, el cemento sellador AH Plus-BisBAL NP'S fue colocado en el fondo de placas de 24 pozos y su posible actividad antibiofilm fue explorada por microscopía de fluorescencia. Se utilizó un biofilm de 48 horas de *E. faecalis* ATCC, cultivo mixto y *E. faecalis* aislado de

conductos radiculares. Se expusieron a los cementos selladores y se incubaron a 37 °C durante 24h. El biofilm remanente se tiñó con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para medir la intensidad fluorescente mediante el uso de un lector de microplacas de Elisa (Promega, Madison, WI) a una longitud de onda de 525 nm.

5.10 Ensayo de microfiltración de AH Plus-BisBAL NPs.

Con el fin de determinar si las BisBAL NPs le otorgan mayor resistencia al paso de bacterias a través del orificio de entrada de los conductos radiculares, se empleó un ensayo de penetración bacteriana de cámara dividida. Para ello se requirieron 50 dientes unirradiculares, de raíz recta y ápice cerrado, se estandarizaron a una longitud de la pieza a 16 mm seccionando la porción coronaria. Se examinó la superficie radicular remanente y se eliminaron piezas que presentaran líneas de fisura, piezas que, al estandarizar la longitud, presentaran remanente coronal y piezas con caries radicular, así como también piezas que al estandarizar la longitud no sea apreciable el conducto radicular. Se tomó la longitud de trabajo con una lima tipo K #15 restando un milímetro apical observado bajo microscopio. Se instrumentaron hasta una lima #50 y posteriormente se esterilizaron en autoclave en recipientes de vidrio con 5 ml de agua destilada para evitar su deshidratación.

Una vez esterilizados se llevaron a una campana de flujo laminar donde se obturaron con gutapercha convencional y se dividieron en 4 grupos: 20 piezas con AH Plus-BisBAL NPs, 20 con AH Plus, 5 piezas se utilizaron como control positivo sin obturación y 5 como control negativo cubiertas de barniz en toda la región radicular. Se cubrieron con 3 capas de barniz con excepción a los últimos 3 mm apicales.

Se cortaron tubos Eppendorf por su punta y fueron insertados en tubos polipropileno estériles sellando la unión con cianocrilato y 3 capas de barniz, se insertaron las piezas en los tubos Eppendorf dejando libre la región apical y se selló con cera pegajosa y 3 capas de barniz. En los tubos de polipropileno se colocaron 11ml de medio de cultivo líquido y estéril de tripticaseína de soya que estuvieron en contacto con los 3 mm apicales de las piezas. Se dejó el dispositivo

en incubadora a 37°C por 5 días para evaluar la ausencia de contaminación durante el ensamblaje del mismo. Pasados los 5 días y comprobando la ausencia de turbidez en los medios de cultivo, en la cámara superior se inoculó diariamente 10 µL de *E. faecalis* y se observó diariamente, si se presenta filtración de la obturación el contenido de la cámara superior va a contaminar la cámara inferior tornándolo turbio.

5.11 Citotoxicidad del AH Plus-BisBAL NPs.

El efecto citotóxico del sellador AH Plus convencional y el suplementado con BisBAL NPs fue evaluado mediante el ensayo de viabilidad MTT sobre cementoblastos humanos. Se colocaron los cementos selladores al fondo de una placa de 96 pozos, posteriormente se le colocaron 1×10^4 de células a cada pozo, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24h. Se utilizaron los siguientes grupos experimentales, AH Plus + 10 µM BisBAL, AH Plus + 50 µM BisBAL, AH Plus + 100 µM BisBAL y como grupos control AH Plus y cementoblastos humanos. Después de 24 horas de incubación, se añadieron 10 µl de MTT a cada pocillo y se incubaron a 37 ° C y 5% de CO₂ por 2 horas en condiciones de oscuridad. Al concluir el tiempo mencionado se procedió a retirar el medio y se colocó 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver el formazán MTT. El MTT reducido se cuantificó con un lector de placas de absorbancia a 595 nm, este ensayo se realizó por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente.

5.12 Análisis estadístico

Los valores obtenidos en cada uno de los ensayos fueron comparados con los resultados de los controles, y además se compararon los resultados entre los diferentes tratamientos. Se utilizó la prueba estadística *t* de Student para obtener los valores de ($p < 0.05$).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de las nanopartículas de bismuto.

Las nanopartículas de bismuto individuales sintetizadas se identificaron de forma esférica en gran medida con un diámetro hidrodinámico promedio ponderado por número de 29,3 nm, pero se agregaron firmemente en grupos más grandes como se puede ver en las imágenes SEM (Figura #1). La identidad del bismuto fue corroborada por su espectro EDX y su patrón de difracción de rayos X.

Characterization of BisBAL NPs by SEM

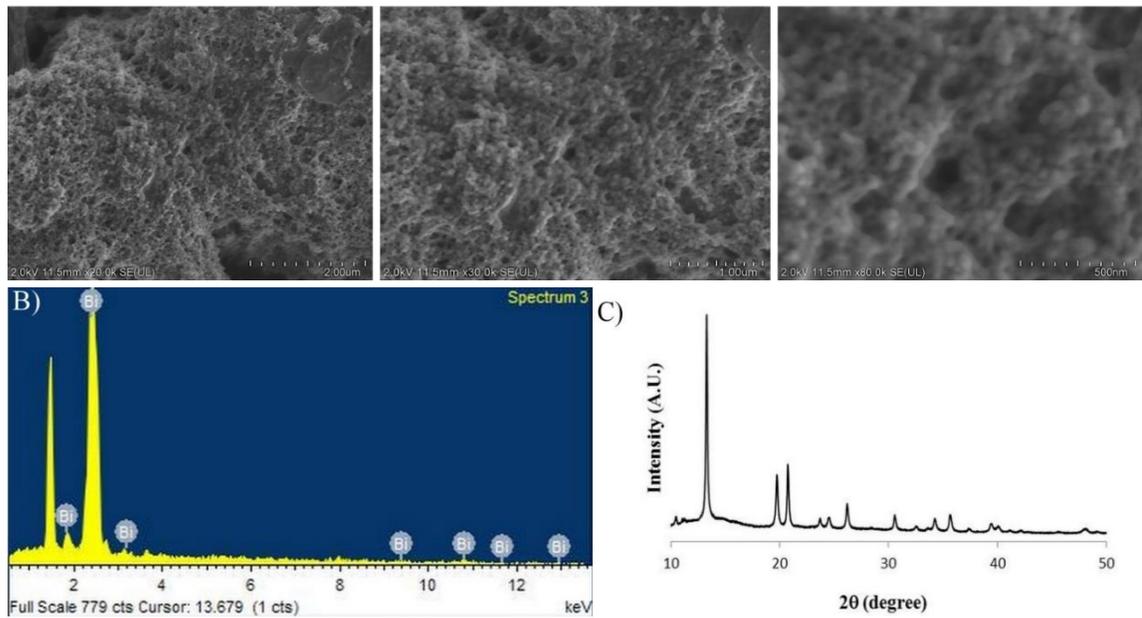


Figura #1. Caracterización de las BisBAL NP's . A) Microscopía electrónica de barrido (SEM), B) Espectro EDS-SEM y C) difracción de rayos X.

6.2 Caracterización del cemento sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se caracterizó el cemento sellador por SEM, en las imágenes superiores vemos el cemento AH Plus convencional, donde apreciamos la formación de macroestructuras poligonales correspondientes al cemento, en las imágenes inferiores se aprecia el sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs, las nanopartículas se visualizan como estructuras esferoidales con un diámetro promedio de 29,3 nm, con afinidad a los macrocristales. La identidad del bismuto en el cemento sellador fue corroborada por su espectro EDX y su patrón de difracción de rayos X (Figura #2).

Characterization of AH⁺-BisBAL NPs by SEM-EDX

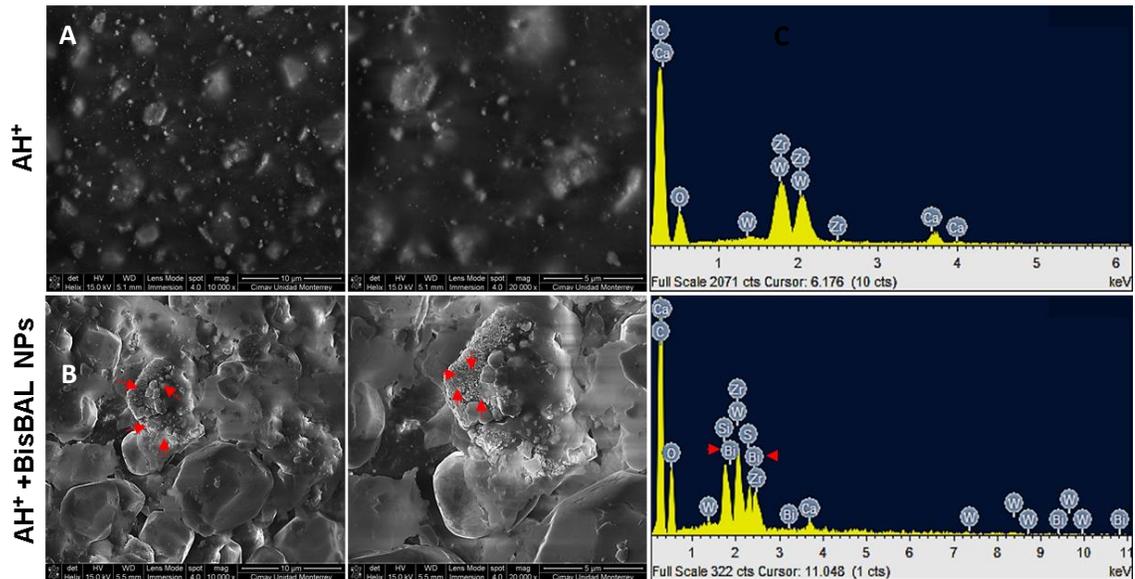


Figura #2. Caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM) (A) cemento sellador, (B) cemento sellador suplementado con BisBAL NP's con su respectivo espectro EDS-SEM (C). Las flechas indican la presencia de nanopartículas de bismuto en el cemento sellador AH Plus.

6.3 Detección de *Enterococcus faecalis* en muestras obtenidas mediante PCR en tiempo real (qPCR).

En cuestión a la identificación de *enterococcus faecalis*, se utilizó el kit genesig qPCR, en la figura #3 podemos observar la curva de color verde, como control positivo del kit genesig, la curva roja es el control positivo de nuestra cepa de laboratorio, la línea azul es el control negativo y la línea negra corresponde a la muestra de paciente, confirmando la presencia de *Enterococcus faecalis*.

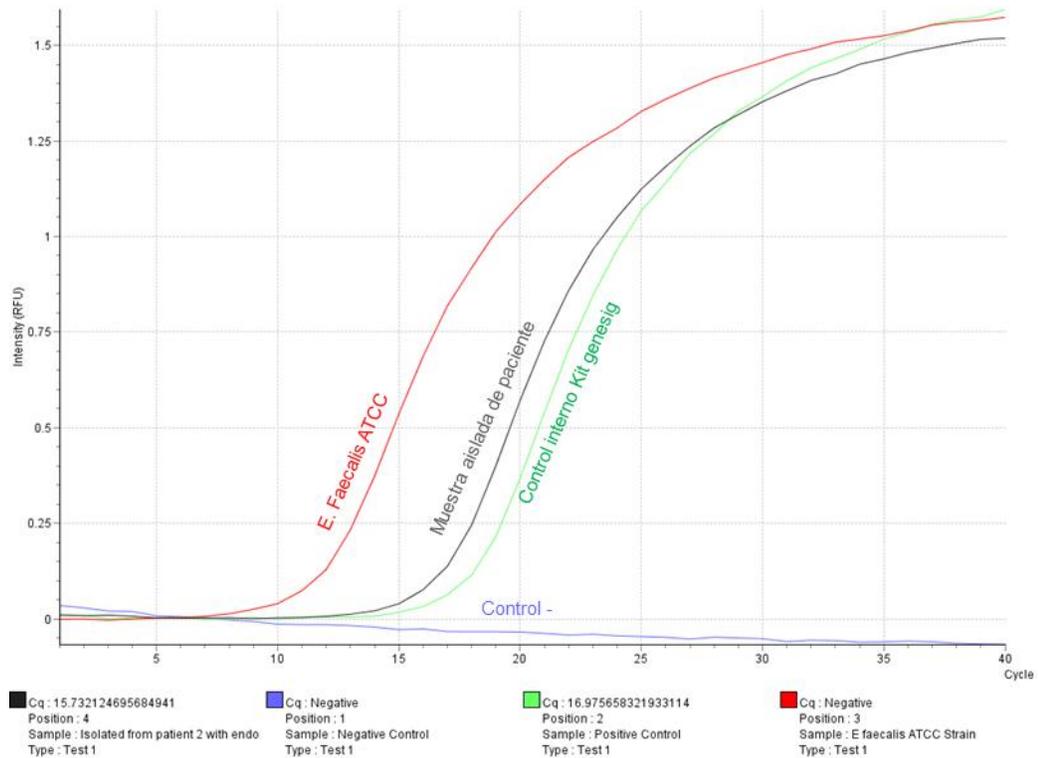


Figura #3. Identificación de *E. faecalis* en muestras aisladas de conductos radiculares mediante el kit genesig PCR en tiempo real

6.4 Actividad antimicrobiana del cemento sellador AH Plus - BisBAL NPs por ensayo de difusión en disco.

Los resultados mostrados nos indican que el cemento sellador de uso endodóntico AH Plus suplementado con 50 μ M BisBAL NPs inhibió el crecimiento bacteriano tanto de *E. faecalis* ATCC, cultivo mixto y *E. faecalis* aislado de conductos radiculares con un halo de inhibición promedio de 18.75 ± 2.71 mm, 18.45 ± 1.38 mm y 17.85 ± 1.05 mm respectivamente con una diferencia significativa en comparación al sellador AH Plus convencional con halos de inhibición de 7.25 ± 0.81 .

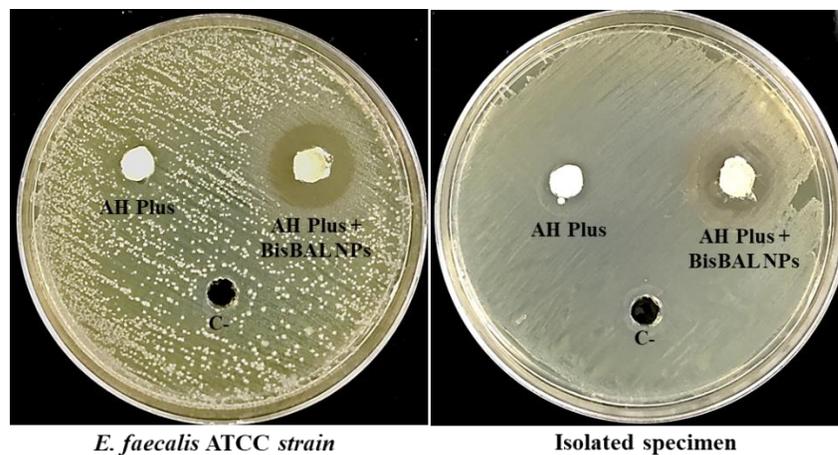


Figura #4. Actividad antimicrobiana de AH plus suplementado con BisBAL NPs mediante ensayo de difusión en disco en cepa de *E. faecalis* ATCC y *E. faecalis* aislado de conductos radiculares. Se determinó el promedio de los experimentos por triplicado para evaluar la veracidad de los resultados.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana del cemento sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs				
	Cementos selladores		Student's test	P value
	AH Plus	AH Plus BisBAL NPs		
Enterococcus faecalis ATCC	10.33 ± 0.8164	18.75 ± 2.7124	7.29	0.0001
Muestra aislada de paciente.	10 ± 0.7559	17.85 ± 1.05	17.68	0.0001

Tabla #2 Actividad antimicrobiana de AH Plus con BisBAL NPs.

6.5 Actividad antibiofilm del cemento sellador AH Plus-BisBAL NPs.

La actividad antibiofilm se evaluó mediante fluorescencia, se desarrollaron biofilms de 48 horas y se expusieron a los cementos selladores, se puede observar que a las 24 horas en los grupos de AH Plus el biofilm mantuvo intensidad fluorescente, lo que indica su viabilidad microbiana post-exposición, mientras que en los grupos de ah plus suplementado con nanopartículas se eliminó el 96% del biofilm, si proyectamos estos resultados a la clínica, estaríamos viendo que a las 24 horas de haber concluido la endodoncia, así es como se vería con AH Plus convencional y así es como se vería a con el cemento con nanopartículas.

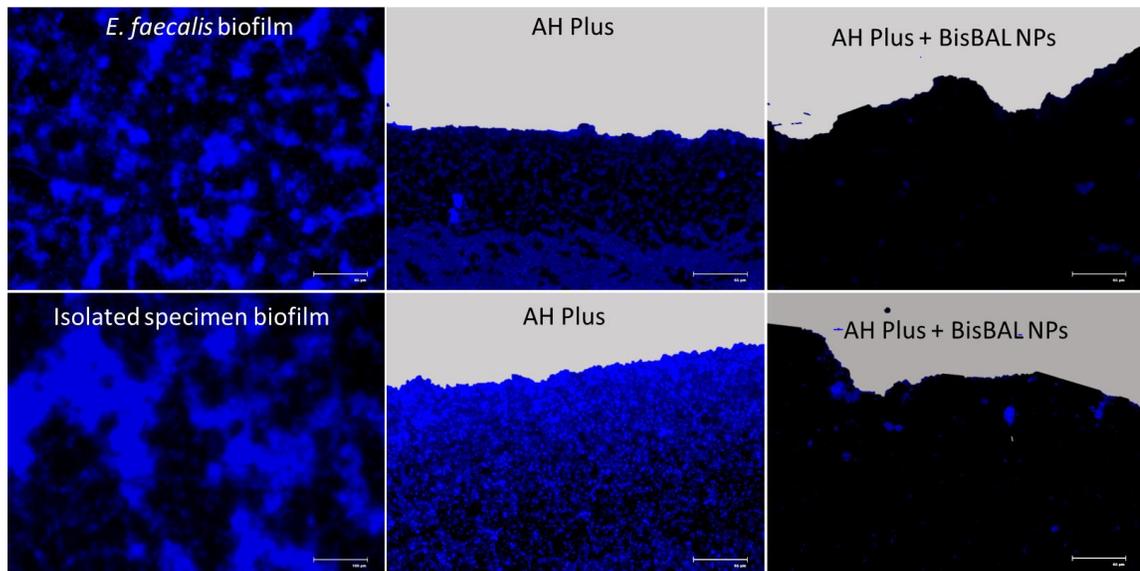


Figura #5. Actividad antibiofilm de AH Plus suplementada con BisBAL NPs mediante microscopía de fluorescencia. AH Plus suplementado con nanopartículas de bismuto se expuso durante 48 horas a biofilms de *E. faecalis* o biopelículas de muestras aisladas. Se empleó AH Plus solo como control negativo y el crecimiento bacteriano (cepa ATCC y aislado clínico humano) se usó como control positivo. La barra indica 65 µm.

6.6 Ensayo de microfiltración.

En el ensayo de microfiltración, concluimos que, a los 12 días de inoculación constante, ninguno de los cementos selladores presento filtración, lo cual indica que hemos conseguido añadir propiedades antimicrobianas y antibiofilm sin comprometer las propiedades de sellado al suplementar el cemento AH Plus.

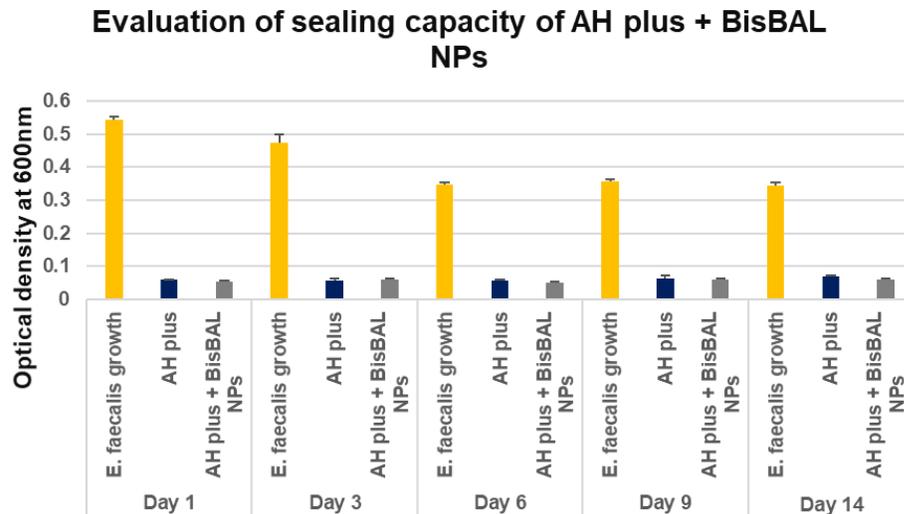


Figura #6. Ensayo de capacidad de sellado de AH Plus y AH Plus + BisBAL NPs evaluado por un periodo de 14 días.

6.7 Citotoxicidad del cemento sellador AH Plus-BisBAL NPs.

Para constatar la selectividad del sellador AH Plus suplementado con BisBAL NPs, se analizó la viabilidad celular en cementoblastos humanos a diferentes concentraciones, los mejores resultados obtenidos son con la concentración de 50 micromolar con un 93%.

La figura #7 muestra el porcentaje de viabilidad de los cementoblastos expuestos a los diferentes grupos de cementos selladores ya fraguados. Se encontró que el cemento sellador AH Plus es el menos citotóxico, seguido del cemento AH Plus suplementado con 50 μM de BisBAL NPs con un 93%, posteriormente AH Plus +10 μM de BisBAL NPs con un 84% y el más tóxico fue el cemento AH Plus suplementado con 100 μM de BisBAL NPs con un 23%.

Lo cual nos dice que, si colocamos el cemento AH Plus suplementado con 50 μM de BisBAL NPs en los pacientes, eliminaremos biofilms remanentes y no se verán afectados en gran medida los cementoblastos.

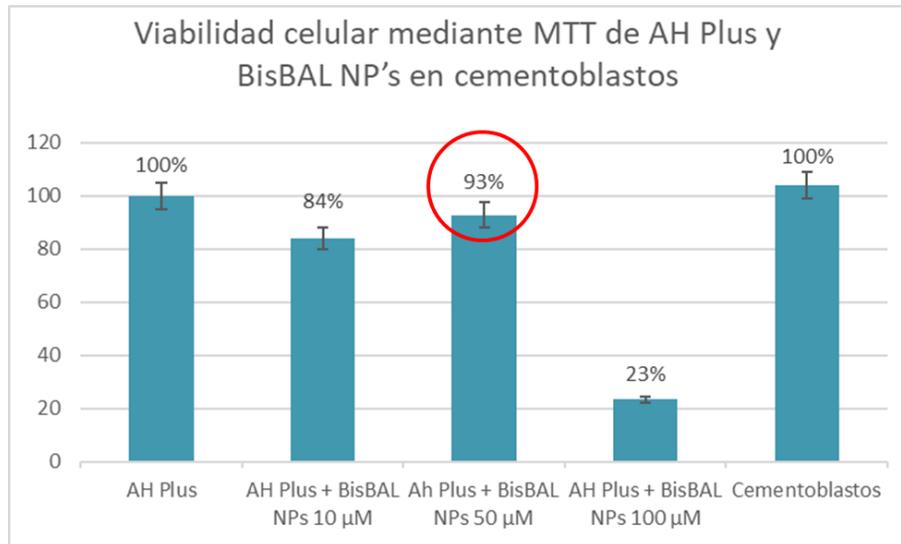


Figura #7. Viabilidad celular mediante ensayo MTT de los cementos selladores ante cementoblastos.

7. DISCUSIÓN

Se han realizado varios enfoques para mejorar los materiales dentales empleados en el tratamiento de endodoncia y tratar de aumentar sus capacidades bactericidas y antibiofilm (Ferrando et. al., 2020 y Agnihotri et. al., 2020). Curiosamente, todavía no hay nuevos materiales dentales disponibles en la práctica clínica. Aunque ha habido muchas investigaciones sobre los efectos antibiofilm de irrigantes y medicamentos, los selladores de conductos radiculares no se han estudiado de manera consistente. Se espera que los selladores de conductos radiculares ocupen y sellen el espacio del conducto preparado para evitar la recontaminación bacteriana. Una de las propiedades deseadas del sellador de conductos radiculares es la eficacia antibacteriana, que puede eliminar las bacterias que quedan en el sistema del conducto radicular y prevenir la penetración de bacterias en caso de filtración (Shrestha y Kishen, 2016 y Barros et. al., 2014). Una solución para esto es la mejora de los cementos selladores mediante la adición de nanopartículas que podrían ayudar a neutralizar los microorganismos que permanecen en el sistema del conducto radicular, mejorando el pronóstico y el éxito endodóntico (Loyola et. al., 2019). El uso del metal en odontología no es nuevo; oro, plata, zinc, platino, titanio, níquel, circonio, se han empleado en la cavidad bucal por sus propiedades mecánicas y de dureza (Gettleman 1991, Gavini et. al., 2018 y Hanawa 2020). Anteriormente, la nanotecnología ha surgido como una nueva disciplina que ofrece desarrollar “fármacos inteligentes” aumentando su relación de superficie a volumen, reactividad química y actividad biológica (Liao y Tjong 2019). Por lo general, las nanopartículas tienen menos de 100 nm con forma esférica y su reactividad está asociada con su tamaño (Morones et. al., 2005). Aunque se han informado varios estudios sobre el uso de la nanotecnología en el área dental, los selladores de conductos radiculares son un campo poco explorado (Song y Ge 2019 y Balhaddad et. al., 2019). El empleo de nanopartículas en materiales dentales para mejorar sus propiedades intrínsecas es más común en los últimos 5 años (Kavoosi et. al., 2018). En el presente estudio se describe el potencial antimicrobiano y antibiofilm del sellador de conductos radiculares AH Plus

complementado con nanopartículas de bismuto lipofílico. Anteriormente, se informó sobre la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de bismuto lipofílico (NP BisBAL) en grampositivos, gramnegativos y hongos (Badireddy et. al., 2014). También se demostró que la adición de BisBAL NP al cemento MTA confiere propiedades antimicrobianas contra el crecimiento de *Enterococcus faecalis* (Hernandez et. al., 2017). Barros et. al., 2014 evaluaron la actividad antimicrobiana y antibiofilm de AH Plus RCS con nanopartículas de polietilenoamina de amonio cuaternario, en cepa ATCC y cepa endodóntica, mostrando que la suplementación provocó una reducción en la densidad óptica solo en la cepa ATCC. Las variaciones observadas en el comportamiento de las 2 cepas subrayan la necesidad de utilizar cepas clínicas. En nuestros experimentos, se encontró que las adiciones de 50 mM de BisBAL NP al AH Plus RCS potencian sus propiedades antimicrobianas contra la cepa ATCC *E. faecalis* y especímenes aislados. Bashayer et al., 2019 describieron el efecto de un nuevo sellador de conductos radiculares que utiliza metacrilato de dimetilaminohexadecilo (DMAHDM) y nanopartículas de plata y redujo la UFC de biopelícula alrededor de 6 veces (Baras et. a., 2019). En nuestros experimentos, AH Plus suplementado con BisBAL NPs mostró una inhibición completa de la formación de biopelículas tanto de la cepa ATCC *E. faecalis* como de las muestras aisladas, en contraste con AH Plus solo. Este resultado está respaldado por la caracterización del AH Plus agregado con BisBAL NP que muestra una distribución homogénea de nanoestructuras de bismuto en AH Plus. Presumimos que las nanopartículas de bismuto mataron a las bacterias cuando están en contacto durante el proceso de adherencia al sellador de conductos radiculares AH Plus / BisBAL NP. Seung et al., 2018 describieron las propiedades bactericidas de AH Plus mezclado con metacrilato de dimetilaminohexadecilo (DMAHDM) y nanopartículas de plata y fue significativamente más bactericida contra *E. faecalis* durante 14 días (Seung et. al., 2018). Para analizar si la adición de BisBAL NP a AH Plus podría modificar sus propiedades básicas como sellador, se desarrolló un modelo de filtración bacteriana de microfiltración. A diferencia de otros estudios, en los que se produjo una filtración del sellador del

conducto radicular AH Plus en el 40% de los grupos a los 7-12 días (Frasen et. al., 2008 y Yucel et. al., 2006). Los resultados obtenidos durante 12 días fueron la ausencia de penetración de bacterias, lo que indica que BisBAL NP mejoró la capacidad de sellado / antimicrobiana de AH Plus. Song et al., 2016 analizaron la microfiltración in vitro de varios selladores nuevos mediante tinción con una solución de azul de metileno al 1% durante dos semanas y los resultados no mostraron diferencias significativas entre todos los selladores probados (Song et. al., 2016). Desafortunadamente, todos los estudios que desarrollaron materiales dentales más agentes bactericidas no evaluaron la posible citotoxicidad para analizar si la mezcla del sellador del conducto radicular con el agente antimicrobiano podría promover la muerte celular en el huésped. Nuestros datos mostraron la ausencia de citotoxicidad de AH Plus-BisBAL NP en cementoblastos analizados por ensayo MTT después de 24 h de exposición. Por el contrario, varios estudios que emplearon nanopartículas de plata informaron una alta citotoxicidad en diferentes tipos de células (Zhang et. al., 2014). A pesar de su amplio uso, las nanopartículas de plata muestran muchos efectos adversos no deseados que incluyen; toxicidad aguda y genotoxicidad (Wen et. al., 2017). Anteriormente, se ha descrito que las nanopartículas de oro, plata y titanio de materiales dentales podrían atravesar la barrera hematoencefálica y promover la neurotoxicidad (Feng et. al., 2015). Nuestro grupo estudió de manera temprana la biocompatibilidad de nanopartículas de bismuto en ratones y los resultados obtenidos confirmaron la biocompatibilidad de nanopartículas de bismuto lipofílico sin signos de daño tisular en ninguno de los órganos analizados (riñón, hígado, cerebro, cerebelo, corazón y yeyuno) (Cabral et. al., 2020).

8. CONCLUSIONES

Con este trabajo podemos concluir que la suplementación con nanopartículas de bismuto otorga un efecto antimicrobiano y antibiofilm significativo, no alteran las propiedades de sellado convencionales, mantienen una selectividad frente a cementoblastos humanos y al observar que los resultados obtenidos en las cepas de laboratorio son muy similares a los obtenidos de las muestras aisladas de conductos radiculares, nos permite ver a corto plazo la aplicación de estas nanopartículas en el entorno clínico.

9. REFERENCIAS

1. Abdelhady W, Bayer A, Seidl K, Moormeier D, Bayles K, Cheung A, Xiong Y. Impact of vancomycin on sarA-mediated biofilm formation: role in persistent endovascular infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2014;209(8):1231-1240.
2. AlShwaimi E, Bogari D, Ajaj R, Al-Shahrani S, Almas K, Majeed A. In Vitro Antimicrobial Effectiveness of Root Canal Sealers against *Enterococcus faecalis*: A Systematic Review. *J Endod*. 2016;42(11):1588–1597.
3. Alves F, Andrade-Junior C, Marceliano-Alves M, Perez A, Rocas I, Versiani M, Sousa-Neto M, Provenzano J, Siqueira J. Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro Computed Tomography and Cryopulverization Approach. *J Endod*. 2016;42:1667–1672.
4. Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rocas IN, Siqueira JF Jr. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod* 2011;37:496–501.
5. Anderl J, Franklin, M, Stewart, P. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1818-1824.
6. Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(4):1251-1256.

7. Badireddy A, Chellam S, Yanina S, Gassman P, Rosso K. Bismuth dimercaptopropanol (BisBAL) inhibits the expression of extracellular polysaccharides and proteins by *Brevundimonas diminuta*: implications for membrane microfiltration. *Biotechnol Bioeng*. 2008;99(3):634–643.
8. Badireddy A, Hernandez R, Sánchez R, Chellam S, Cabral C. Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation. *J Nanopart Res*. 2014;16(6).
9. Badireddy AR, Marinakos SM, Chellam S, Wiesner MR. Lipophilic nano-bismuth inhibits bacterial growth, attachment, and biofilm formation. *Surf Innov*. 2013;1(3):181–189.
10. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia A, Ferraz C, Almeida J, Gomes B. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *J. Endod*. 2016;42:1022–1028.
11. Barros J, Silva MG, Rôças IN, Gonçalves LS, Alves FF, Lopes MA, Pina-Vaz I, Siqueira JF Jr. Antibiofilm effects of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *J Endod*. 2014 Aug;40(8):1167-71.
12. Bolhari B, Bahador A, Khoshkhounejad M, Afshar MS, Moghaddaszadeh M. Evaluation of the Effect of MTAD on Expression of *Enterococcus faecalis* Virulence Factors Considering the Role of Different Obturating Materials. *J Dent*. 2018;15(6):382-392.

13. Caggianiello G, Kleerebezem M, Spano G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100:3877–3886.
14. Carbajal Mejía JB. Antimicrobial effects of calcium hydroxide, chlorhexidine, and propolis on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *J Investig Clin Dent.* 2014;5(3):194-200.
15. Cintra L, Benetti F, de Azevedo Queiroz O, Ferreira L, Massunari L, Bueno C, Gomes-Filho J. Evaluation of the Cytotoxicity and Biocompatibility of New Resin Epoxy-based Endodontic Sealer Containing Calcium Hydroxide.” *Journal of endodontics. J Endod.* 2017;43(12):2088-2092.
16. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. Formaldehyde evaluation from endodontic materials. *Oral Health* 1998;88(12):37-9.
17. DaSilva L, Finer Y, Friedman S, et al. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *J Endod* 2013;39:249–53.
18. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005;84(2):118-32.
19. Dong D, Thomas N, Thierry B, Vreugde S, Prestidge CA, Wormald PJ. Distribution and inhibition of liposomes on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PLoS One.* 2015;10:e0131806.
20. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995;6(2):85-90.

21. Flemming H, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S, Kjelleberg S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14:563–575.
22. Flemming HC. EPS-Then and Now. *Microorganisms.* 2016;4(4):41.
23. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997;11:160–7.
24. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filbo FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 2008;34:537–40.
25. Graziano TS, Cuzzullin M, Franco G, Schwartz-Filho H, de Andrade E, Groppo F, Cogo-Müller K. Statins and Antimicrobial Effects: Simvastatin as a Potential Drug against *Staphylococcus aureus* Biofilm. *PLoS One.* 2015;10(5):e0128098.
26. Grossman L, Oliet S, Del rio C. *Endodontic practice*, 11th ed. Philadelphia: Lea & Fibiger; 1988: pp.242.
27. Guinesi AS, Faria G, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho I. Influence of sealer placement technique on the quality of root canal filling by lateral compaction or single cone. *Braz Dent J* 2014; 25: 117–22.
28. Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res* 1996;368(3-4):181-94.
29. Helling I, Chandler NP. The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers. *J Endod* 1996;22:257–9.

30. Hernandez R, Del Angel C, Solís J, Munguia S, Pineda N, Sánchez R. Antimicrobial and antibiofilm activities of MTA supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles. *Dent Mater J.* 2017;36:503-10.
31. Hernandez R, Velasco D, Diaz D. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2109-2113.
32. Hernandez R, Velasco D, Martinez J, Diaz D, Zumeta I, Arevalo K, Cabral C. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:1645–1652.
33. Hernandez-Delgadillo R, Del Angel-Mosqueda C, Solís-Soto JM, Munguia-Moreno S, Pineda-Aguilar N, Sánchez-Nájera RI. Antimicrobial and antibiofilm activities of MTA supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles. *Dental materials journal* 2017; 36: 503-10.
34. Hess D, Solomon E, Spears R, He J. Retreatability of a bioceramic root canal sealing material. *J Endod* 2011;37:1547–9.
35. Hinrichs JE, Math VT. The role of dental calculus and other local predisposing factors. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA, eds. *Carranza's Clinical Periodontology*, 12th ed. St Louis: Elsevier/Saunders 2015:116–31.
36. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC Cytotoxicity of resin, zinc oxideeugenol- and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J.* 2002;35(2):153-158.

37. Jenkinson HF. Adherence and accumulation of oral streptococci. *Trends Microbiol.* 1994;2(6):209–212.
38. Kaldalu, N.; Hauryliuk, V.; Tenson, T. Persisters-as elusive as ever. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100:6545–6553.
39. Kapralos V, Koutroulis A, Ørstavik D, Sunde P, Rukke H. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers against Planktonic Bacteria and Bacteria in Biofilms. *J Endod.* 2018;44(1):149–154.
40. Karahan S, Erden A, Bulut K, Basak M, Aslan T, Cetinkaya A, Avci D. A case of bismuth intoxication with irreversible renal damage. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2013;6:241-243.
41. Katebzadeh N, Sigurdsson A, Trope M. Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root canals: an in vivo study. *Int Endod* 2000;33(1):60-6.
42. Keles A, Ahmetoglu F, Ocak MS, Dayi B, Bozkurt A, Orucoglu H. Comparative analysis of three different filling techniques and the effects of experimental internal resorptive cavities on apical microleakage. *Eur J Dent.* 2014; 8: 32–7.
43. Kirk R, Othmer D. *Encyclopedia of chemical technology*, Wiley. 1998.
44. Kishen A. *Nanotechnology in Endodontics: Current and Potential Clinical Applications*, 1st ed. Switzerland: Springer; 2015.
45. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens.* 2013;2;288–356.
46. Lebreton F, Willems R, Gilmore M. Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. In *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection.* 2014. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

47. Li GH, Niu LN, Zhang W, Olsen M, De-Deus G, Eid AA, Chen JH, Pashley DH, Tay FR. Ability of new obturation materials to improve the seal of the root canal system: a review. *Acta Biomater.* 2014;10(3):1050-1063.
48. Linkov I, Satterstrom FK, Corey LM. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomed Nanotechnol Biol Med.* 2008;4(2):167–171.
49. Lomçali G, Sen BH, Cankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1996;12:70-6.
50. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13:171–83.
51. Loyola-Rodríguez, J. P., Torres-Méndez, F., Espinosa-Cristobal, L. F., García-Cortes, J. O., Loyola-Leyva, A., González, F. J., ... Contreras-Palma, G. (2019). Antimicrobial activity of endodontic sealers and medications containing chitosan and silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 17(3), 228080001985177.
52. Mangwani, N.; Kumari, S.; Das, S. Bacterial biofilms and quorum sensing: Fidelity in bioremediation technology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2016, 32, 43–73.
53. Marciano MA, Guimaraes BM, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardineli N, Andrade FB, Moraes IG, Duarte MA. Physical properties and interfacial adaptation of three epoxy resin-based sealers. *J Endod* 2011;37(10):1417–1421.

54. Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *J Endod* 2003;29:194–200.
55. Maurer, J.J., Rapid detection and limitations of molecular techniques. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2011;2:259-79.
56. Minju S, Hyeon K, Woocheol L, Euseong K. Analysis of the Cause of Failure in Nonsurgical Endodontic Treatment by Microscopic Inspection during Endodontic Microsurgery. *J Endod*. 2011;37:1516-1519.
57. Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. *Biomed J*. 2013;36(2):59-70.
58. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 65(1–2):55–63.
59. Neelakantan, P., Romero, M., Vera, J., Daood, U., Khan, A., Yan, A., & Cheung, G. (2017). Biofilms in Endodontics—Current Status and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1748.
60. Orstravik D. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endod Topics* 2005;12:25–38
61. Pascon E, Leonardo M, Safavi K, Langeland K. Tissue reaction to endodontic materials: Methods, criteria, assessment, and observations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1991;72(2);222–237.
62. Perez F, Calas P, de Falguerolles A, Maurette A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. *J Endod* 1993;19:297–301.

63. Pericàs J, Corredoira J, Moreno A, García-País M, Falces C, Rabuñal R, Miró J. Relationship between *Enterococcus faecalis* infective endocarditis and colorectal neoplasm: Preliminary results from a cohort of 154 patients. *Rev Esp Cardiol.* 2017;70(6):451-458.
64. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001;27:76-81.
65. Peters O, Schonenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J.* 2001;34:221–30.
66. Pradeep J, Stephen S, Ambrose S, Gunasekaran D. Diagnosis of Acute Q Fever by Detection of *Coxiella burnetii* DNA using Real-Time PCR, Employing a Commercial Genesig Easy Kit. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2017; 11: DC10-DC3.
67. Qayyum S, Sharma D, Bisht D, Khan A. Protein translation machinery holds a key for transition of planktonic cells to biofilm state in *Enterococcus faecalis*: A proteomic approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016;474:652–659.
68. Raven K, Reuter S, Gouliouris T, Reynolds R, Russell J, Brown N, Peacock S. Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. *Nat Microbiol.* 2016;1:15033.
69. Rene H, Badireddy A, Juan José M, Juan Francisco C, Gustavo Israel, M, Rosa Isela S, Claudio C. Cytotoxic Effect of Lipophilic Bismuth Dimercaptopropanol Nanoparticles on Epithelial Cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016;16(1):203-209.

70. Ricucci D, Siqueira JF Jr, Lopes WS. Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *J Endod* 2015;41:265–73.
71. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36:1277–88.
72. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. *J Endod* 2011;37:1171–5.
73. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004;30(5):315-320.
74. Ruparel NB, Ruparel SB, Chen PB, Ishikawa B, Diogenes A. Direct effect of endodontic sealers on trigeminal neuronal activity. *J Endod*. 2014 May;40(5):683-7.
75. Salehrabi R, Rotstein I. Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study. *J Endod* 2004;30:846–50.
76. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, et al. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31:97–100.
77. Schafer E, Olthoff G. Effect of three different sealers on the sealing ability of both Thermafil obturators and cold laterally compacted gutta-percha. *J Endod* 2002; 28:638–42.
78. Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am* 1967;1:723–44.
79. Shakibaie M, Hajighasemi E, Adeli-Sardou M, Doostmohammadi M, Forootanfar H. Antimicrobial and anti-biofilm activities of Bi subnitrate and

- BiNPs produced by *Delftia* sp. SFG against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *IET Nanobiotechnol.* 2019;13(4):377-381.
80. Shrestha A, Kishen A. Antibiofilm efficacy of photosensitizer-functionalized bioactive nanoparticles on multispecies biofilm. *J Endod.* 2014 Oct;40(10):1604-10. doi: 10.1016/j.joen.2014.03.009. Epub 2014 Apr 29. PMID: 25260731.
81. Singh H, Das S, Yadav J, Srivastava VK, Jyoti A, Kaushik S. In search of novel protein drug targets for treatment of *Enterococcus faecalis* infections. *Chem Biol Drug Des.* 2019;94(4):1721-1739
82. Siqueira JF Jr, de Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22:308–10.
83. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93:174–8.
84. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod* 2002;28:770–3.
85. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:281–93.
86. Siqueira JF Jr. *Treatment of endodontic infections.* London: Quintessence Publishing; 2011.
87. Siqueira Jr JF, Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291–301.

88. Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, Matalon S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. *J Endod.* 2008;34(6):735-738.
89. Southey-Pillig CJ, Davies DG, Sauer K. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol.* 2005;187(23):8114-8126.81.
90. Spangberg L, Haapasalo M. Rationale and efficacy of root canal medicaments and root filling materials with emphasis on treatment outcome. *Endod Topics* 2002;2:35–58.
91. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86–93.
92. Sundqvist G, Figdor D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, eds. *Essential Endodontology. Prevention and Treatment of Apical Periodontitis.* Oxford: Blackwell; 1998.
93. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Top* 2004;9:27–36.
94. Tabassum S, Khan F. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *Eur J Dent.* 2016;10:144-7.
95. Teixeira ABV, de Castro DT, Schiavon MA, Dos Reis AC. Cytotoxicity and release ions of endodontic sealers incorporated with a silver and vanadium base nanomaterial. *Odontology.* 2020 Oct;108(4):661-668.
96. Teixeira, A., Vidal, C. L., de Castro, D. T., de Oliveira-Santos, C., Schiavon, M. A., & Dos Reis, A. C. (2017). Incorporating Antimicrobial Nanomaterial and

its Effect on the Antimicrobial Activity, Flow and Radiopacity of Endodontic Sealers. European endodontic journal, 2(1), 1–6.
<https://doi.org/10.14744/eej.2017.16029>

97. Torabinejad M, White S. Endodontic treatment options after unsuccessful initial root canal treatment. J Am Dent Assoc. 2016;147(3):214-20.
98. Trope M, Bunes A, Debelian G. Root filling materials and techniques: bioceramics a new hope? Endod Topics 2015;32:86–96.
99. Tsaur SM, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC. Antimicrobial susceptibility of enterococci in vitro. Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi 1993; 92: 547-52.
100. Van Hassel, J.H. Conference on inflammation, discussion. J Endod 3 (7):248 260, 1977.
101. Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the Enterococcus faecalis cytolysin. Toxins (Basel). 2013;5(5):895-911.
102. Versiani MA, Pecora JD, de Sousa-Neto MD. Flat-oval root canal preparation with self-adjusting file instrument: a micro-computed tomography study. J Endod 2011;37:1002–7.
103. Viapiana R, Baluci CA, Tanomaru-Filho M, et al. Investigation of chemical changes in sealers during application of the warm vertical compaction technique. Int Endod J 2015;48:16–27.
104. Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. In vitro yeast infection of human dentin. J Endod 2000;26:207–9.

105. Weidenmaier C, Peschel A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(4):276-287.
106. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *Journal of endodontics* 2006; 32: 715-21.
107. Wu MK, Kast'akova A, Wesselink PR. Quality of cold and warm gutta percha fillings in oval canals in mandibular premolars. *Int Endod J* 2001;34:485–91.
108. Wu MK, Van Der Sluis LW, Wesselink PR. Fluid transport along gutta-percha backfills with and without sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:257–62.
109. Xu Q, Ling J, Cheung GS, Hu Y. A quantitative evaluation of sealing ability of 4 obturation techniques by using a glucose leakage test. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:e109–13.
110. Yoon J, Cho B, Bae J, Choi Y. Anatomical analysis of the resected roots of mandibular first molars after failed non-surgical retreatment. *Restor Dent Endod.* 2018;5;43(2):e16.
111. Yue H, Eastman PS, Wang BB, et al. An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(8):E41-e41.

112. Zehnder M, Waltimo T, Sener B, Soderling E. Dentin enhances the effectiveness of bioactive glass S53P4 against a strain of *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:530–5.
113. Zhao J, Shen Y, Haapasalo M, Wang Z., Wang Q. A 3D numerical study of antimicrobial persistence in heterogeneous multi-species biofilms. *J. Theor. Biol.* 2016, 392, 83–98.
114. Zhu X, Radovic-Moreno AF, Wu J, Langer R, Shi J. Nanomedicine in the Management of Microbial Infection - Overview and Perspectives. *Nano Today*. 2014;9(4):478-498.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Jesús Alejandro Torres Betancourt

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Endodoncia

Tesis: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DEL CEMENTO SELLADOR AH PLUS SUPLEMENTADO CON NANOPARTÍCULAS LIPOFÍLICAS DE BISMUTO SOBRE *Enterococcus faecalis*, CULTIVO MIXTO Y MICROORGANISMOS AISLADOS DE CONDUCTOS RADICULARES

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, hijo de José de Jesús Torres Cervantes y Claudia Ibeth Betancourt Rodríguez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en 2018.

Experiencia Profesional: Instructor de unidad de aprendizaje en el Departamento de Anatomía Humana Pregrado y Endodoncia Pregrado de la Facultad de Odontología desde 2014 y 2016.

PUBLICACIONES:

Publicación en curso de trabajo de tesis titulado "Antimicrobial and antibiofilm activity of AH plus sealer supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles on *Enterococcus faecalis* ATCC, mixture culture and *E. faecalis* isolated from root canals."

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS:

Reconocimiento al primer lugar en el Congreso Virtual AMEAC, 7 de noviembre 2020.

Reconocimiento por la participación en el segundo encuentro académico en línea de la IADR división mexicana de la International Association for Dental Research, 25 de mayo 2021.