

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DE UN HIDROGEL
CARGADO CON VANCOMICINA Y NANOPARTÍCULAS LIPOFÍLICAS DE
BISMUTO COMO MEDICACIÓN INTRACONDUCTO”**

POR

C.D. HERIBERTO CÁRDENAS DOMÍNGUEZ

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

Diciembre, 2023

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DE UN HIDROGEL CARGADO
CON VANCOMICINA Y NANOPARTÍCULAS LIPOFÍLICAS DE BISMUTO COMO
MEDICACIÓN INTRA CONDUCTO**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

Por:

C.D. HERIBERTO CÁRDENAS DOMÍNGUEZ

Comité de Examen de Tesis

Dr. Jorge Jaime Flores Treviño
Presidente

Dr. Claudio Cabral Romero
Secretario

Dr. (a).

Vocal

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DE UN HIDROGEL CARGADO
CON VANCOMICINA Y NANOPARTÍCULAS LIPOFÍLICAS DE BISMUTO COMO
MEDICACIÓN INTRA CONDUCTO**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

Por:

C.D. HERIBERTO CÁRDENAS DOMÍNGUEZ

Comité de Tesis

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

**Dr. Juan Manuel Solís Soto
Co-Director de Tesis**

**Dr. Rene Hernández Delgadillo
Asesor Metodológico**

DEDICATORIA

Para mi resulta importante agradecer primero a Dios por darme la oportunidad de haber estudiado esta especialidad, ya que definitivamente resulta para mi una bendición enorme que se me presentara esta oportunidad tan enorme. A mis papás, Heriberto y Martha, quienes me apoyaron en todo momento, desde el momento en que les mencioné que quería estudiar una especialidad hasta el último día, en lo económico, emocional y en todos los aspectos. A mi hermana, Saraí, quien su ayuda en lo intelectual y mi admiración hacia ella, una mujer inteligente y aplicada que contagia ese amor y pasión por servir a los demás en el área médica. También agradecer a mi novia, Michelle, quien durante estos dos años de estudio fue un apoyo en todo momento, en los momentos duros siempre estuvo ahí para darme ánimos y escucharme, y en los momentos de felicidad, alegrarse junto con mi familia y conmigo. A mi coordinador el Dr. Jorge Flores, quien me apoyo en mis ideas y en todo momento para poder llevar a cabo este trabajo de investigación, sumando el hecho de que, de no ser por él, yo no estaría presentando este trabajo partiendo desde el aceptarme estudiar aquí. Agradezco también a el Dr. Alejandro Bentacourt, quien fue de los que más me apoyo en mi trabajo, con su motivación y su experiencia se convirtió en un maestro para mí, amigo y una persona a la cual admiro mucho. Finalmente, al Dr Claudio mi director de tesis, quien es de las personas a las cuales le aprendí muchísimo en este tiempo de estudio, gracias por su paciencia y su enseñanza, y por todo su conocimiento que heredó en mí.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS.....	¡Error! Marcador no definido.
5.1 Objetivo General.....	14
5.2 Objetivos Específicos.....	14
6. ANTECEDENTES.....	14
6.1 Endodoncia.....	15
6.1.1 Infección del conducto radicular (BioFilm).....	15
6.1.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	16
6.2 Tratamiento endodóntico.....	17
6.2.1 Instrumentación mecánica.....	17
6.2.2 Medicación intraconducto.....	17
6.2.3 Hidróxido de calcio.....	17
6.2.4 Pasta triple antibiótica (TAP).....	18
6.2.5 Pasta doble antibiótica (DAP).....	19
6.2.6 Mezclas con CaOH ₂	19
6.3 Farmacología.....	20
6.3.1 Antibióticos.....	20
6.3.1.1 Vancomicina.....	21
6.4 Nanotecnología.....	21
6.4.1 BisBAL NP.....	21
6.5 Hidrogel.....	22
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
7.1 Síntesis y caracterización del hidrogel BisBAL NPs-Val.....	23

7.2 Toma de aislados de pacientes de <i>E. faecalis</i> y preparación de discos de dentina.....	23
7.2.1. Toma de muestras para aislamiento de <i>E. faecalis</i> a partir de pacientes con infección endodóntica.....	23
7.2.2 Aislamiento de <i>E. faecalis</i> por MALDI Biotyper system.....	24
7.2.3 Obtención de los discos de dentina.....	24
7.2.4 Activación y crecimiento de microorganismos.....	25
7.3 Actividad antimicrobiana de BisBAL NP-Van mediante ensayos de difusión en disco.....	25
7.4 Ensayo de viabilidad celular <i>Live/dead</i>	26
7.5 Actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre el biofilm de <i>E. faecalis</i> aislado de paciente sobre discos de dentina.....	26
7.6 Ensayo de viabilidad celular.....	27
7.6.1 Cultivo celular.....	27
7.6.2 Citotoxicidad del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre fibroblastos humanos.....	28
7.7 Análisis estadístico.....	28
8. RESULTADOS.....	29
8.1 Caracterización del hidrogel BisBAL NPs-Van.....	29
8.2 Aislamiento de <i>E. faecalis</i> a partir de pacientes con infección endodóntica.....	29
8.3 Actividad antimicrobiana de BisBAL NPs-Van mediante ensayos de difusión en disco.....	30
8.4 Actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van mediante ensayo de <i>Live/dead</i> y microscopia de fluorescencia.....	34
8.5 Actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre el biofilm de <i>E. faecalis</i> aislado de paciente sobre discos de dentina por microscopia electrónica de barrido (SEM).....	36
8.6 Citotoxicidad del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre fibroblastos humanos.....	37
9. DISCUSIÓN.....	39
10. CONCLUSIÓN.....	42

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El éxito del tratamiento endodóntico radica en la desinfección de conductos radiculares y cámara pulpar y un biofilm remanente de *E. faecalis* se asocia a una de las principales causas del fracaso endodóntico. **OBJETIVO:** Evaluar el efecto sinérgico antimicrobiano y antibiofilm de un hidrogel cargado con nanopartículas de bismuto y vancomicina (BisBAL NP-Van; 1:1) sobre *Enterococcus faecalis* aislado de pacientes. **METODOLOGÍA: RESULTADOS:** Dentro de los resultados obtenidos se detectó una presencia homogénea de BisBAL NPs dentro del hidrogel al analizarlo por microscopia electrónica de barrido (SEM). El hidrogel cargado con BisBAL NP y vancomicina mostro un efecto antimicrobiano sinérgico. 1000 μ M del hidrogel desarrollo un halo de inhibición de 31 mm sobre *E. faecalis* (paciente con re-tratamiento), mientras que 1000 μ M de BisBAL NP solas fue de 22 mm y 1mM de vancomicina sola de 1mm ($p < 0.0001$.) En contraste 0.12% de clorhexidina solo inhibió 19 mm ($p < 0.0001$). 24h de tratamiento con el hidrogel 1mM BisBAL NP-Van removió el 99% del biofilm formado por *E. faecalis* sobre discos de dentina detectado por microscopia electrónica de barrido (SEM). Al analizar la posible citotoxicidad del hidrogel, se observó que 24h-post exposición los fibroblastos humanos conservan más de 80% de su crecimiento. **CONCLUSIONES:** En conclusión, el hidrogel biodegradable BisBAL NP-Van constituye una alternativa innovadora y segura para ser utilizado como medicación intraconducto en el tratamiento de las infecciones endodónticas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The success of endodontic treatment lies in the disinfection of root canals and pulp chamber and a remaining biofilm of *E. faecalis* is associated with one of the main causes of endodontic failure. **OBJECTIVE:** To evaluate the synergistic antimicrobial and antibiofilm effect of a hydrogel loaded with bismuth and vancomycin nanoparticles (BisBAL NP-Van; 1:1) on *Enterococcus faecalis* isolated from patients. **METHODOLOGY:** **RESULTS:** Within the results obtained, a homogeneous presence of BisBAL NPs was detected within the hydrogel when analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The hydrogel loaded with BisBAL NP and vancomycin showed a synergistic antimicrobial effect. 1000 μM of the hydrogel developed a 31 mm halo of inhibition on *E. faecalis* (re-treatment patient), while 1000 μM of BisBAL NP alone was 22 mm and 1mM of vancomycin alone was 1mm ($p < 0.0001$.) In contrast, 0.12% chlorhexidine only inhibited 19 mm ($p < 0.0001$). 24h of treatment with the 1mM BisBAL NP-Van hydrogel removed 99% of the biofilm formed by *E. faecalis* on dentin discs detected by scanning electron microscopy (SEM). When analyzing the possible cytotoxicity of the hydrogel, it was observed that 24h-post exposure, human fibroblasts retain more than 80% of their growth. **CONCLUSIONS:** In conclusion, the biodegradable hydrogel BisBAL NP-Van constitutes an innovative and safe alternative to be used as intracanal medication in the treatment of endodontic infections.

1. INTRODUCCIÓN

La limpieza y desinfección de los conductos radiculares consta de un trabajo químico mecánico, con lo cual se busca preservar la pieza dental y prolongar su tiempo de vida dentro de la cavidad oral. Sin embargo, la tasa de éxito del tratamiento depende en gran parte de la desinfección, siendo una de las principales causas del fracaso endodóntico. La dificultad de eliminarlas estas bacterias se debe principalmente de la forma en que están presentes, biofilm, que básicamente un biofilm consiste en microorganismos adheridos a una interfase y creciendo dentro de un matriz que incluye sustancias exopoliméricas (Jass, J., *et al.*, 2003). A esto se le suma el tipo de bacterias tan agresivas presentes, siendo *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) la bacteria principal en el área de endodoncia.

El aspecto químico como se menciona es igual de importante que el trabajo mecánico, ya que prácticamente actúa sobre las áreas que la instrumentación mecánica no logró actuar. El hidróxido de calcio (CaOH_2) es el material más utilizado como medicación intraconducto para actuar de manera química sobre la infección del conducto radicular. Esto último no descarta el hecho de que tiene desventajas utilizarlo, tanto así que existe ya la práctica endodóntica sin utilizarlo entre cita y cita, dejando únicamente el conducto humedecido en hipoclorito de sodio, ya que el CaOH_2 es complicado de colocarlo y asegurar de que este tocando todas las paredes, que llegue hasta la parte más apical, así como su dificultad para eliminarlo. A demás sus propiedades antimicrobianas son muy limitadas en cuanto a su espectro, esto incluye el hecho de que no tiene efecto sobre *E. faecalis* (Siqueira, J. F., Lopes, H. P, 1999).

Sin embargo, el CaOH_2 es un material que puede no llegar a ser suficientemente efectivo, o con propiedades cuestionables que permiten buscar la manera de proporcionar un material más adecuado. Las principales propiedades que se buscarían en un nuevo material que funcione como medicación intraconducto, sería que tenga una actividad antimicrobiana, antibiofilm, actuando principalmente sobre el *E. faecalis*, además, que sea más manipulable y fácil de remover que el CaOH_2 .

En base a estos objetivos, surge la idea de elaborar un material que, junto con los demás procedimientos llevados en el tratamiento, logre una mejor desinfección de cámara pulpar y conductos radiculares. La Vancomicina y BisBAL NPs lipofílicas (BisBAL NP-Van), tienen ciertas propiedades individuales que van desde una actividad antimicrobiana, hasta un potencial antibiofilm, de manera que podemos formar una sinergia entre estos tres y colocándolos en forma de hidrogel, que aporte una propiedad de mejor manejo clínico e incluso que en menor tiempo de exposición elimine mayor cantidad de bacterias.

De manera que esta investigación propone exponer dicho hidrogel con BisBAL NP-Van en cepas de *E. faecalis* y cepas aisladas de pacientes para probar su potencial con las propiedades mencionadas anteriormente mediante ensayo de difusión en disco para la actividad antimicrobiana y en placas de 48 pozos para realizar el ensayo de Live and Death junto con un conteo bacteriano, así como probar su citotoxicidad con ensayos de viabilidad celular y observar mediante imágenes de SEM su capacidad de eliminar el biofilm sobre discos de dentina.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El objetivo principal de la endodoncia se puede decir va sobre la carga bacteriana existente dentro de los conductos radiculares. Para reducir la cantidad de bacterias presente en los conductos los pasos básicamente consisten en la instrumentación y la irrigación de los conductos, y en los casos donde y existe una infección en los conductos, existe el uso de materiales que sirven como medicamento intraconducto para actuar entre citas y ayudar a eliminar la mayor cantidad de bacterias posibles. En este estudio se presenta un hidrogel compuesto por Vancomicina y BisBAL NPs (BisBAL NP-Van) como alternativa como medicamento para conductos radiculares. Las propiedades que presenta cada uno de los productos que se proponen, son principalmente actividad antimicrobiana y antibiofilm, así como atacar precisamente al *E. faecalis*, de manera que se logre una sinergia entre estos tres sumando el hecho de que si se presentan de forma de hidrogel contará con un menor tiempo de exposición y se obtendrá una mejor desinfección.

¿Cuál será el potencial antimicrobiano y antibiofilm de un hidrogel conformado por Vancomicina y BisBAL NPs contra *E. faecalis*?

3. JUSTIFICACIÓN

BisBAL NP-Van en presentación de hidrogel tiene un buen potencial en cuanto a sus propiedades antimicrobianas y antibiofilm, probado sobre cepas de *E. faecalis*, Empezando por la manera en que cada una de estas presenta propiedades que funcionan como una sinergia en el hidrogel.

La vancomicina es un antibiótico que se utiliza para las infecciones por grampositivos, incluido el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Las pautas de vancomicina de 2020 sobre la dosificación, recomienda utilizarse de manera óptima bajo la curva de concentración-tiempo durante 24 h para el objetivo de MIC (AUC/MIC) de 400 a 600 mg (Phillips M, *et al.*, 2023).

De igual manera, BisBAL NPs ha demostrado antes ya tener un buen potencial contra bacterias patógenas orales, incluyendo *E. faecalis*. De igual manera su potencial sinérgico con otras sustancias, favorece en su actividad antimicrobiana, así como su actividad antibiofilm (Torres-Betancourt JA, *et al.*, 2022).

La presentación de BisBAL NP-Van como hidrogel, facilitará muchísimo su uso en cuanto a su aplicación y eliminación, favoreciendo de igual manera en que el tiempo de exposición será menos teniendo mejores resultados en cuanto a su desinfección.

4. HIPÓTESIS

Un hidrogel cargado con Vancomicina y BisBAL NPs tendrá un efecto sinérgico antimicrobiano y antibiofilm sobre *E. faecalis* aislado de pacientes para ser utilizado como medicación intraconducto.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de un hidrogel cargado de Vancomicina y BisBAL NPs como medicación intraconducto.

5.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar el hidrogel cargado con Vancomicina y BisBAL NPs (BisBAL NP-Van) mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).
- Aislar cepas de *E. faecalis* de pacientes con infección endodóntica mediante MALDI Biotyper system.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de BisBAL NP-Van sobre *E. faecalis* ATCC y aislado de pacientes por ensayos de difusión en disco y viabilidad celular MTT.
- Analizar la actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NP-Van sobre el biofilm de *E. faecalis* aislado de paciente mediante el ensayo de Live/Dead y microscopia de fluorescencia.
- Evaluar la actividad antibiofilm de BisBAL NP-Van sobre el biofilm de *E. faecalis* (aisladas de pacientes) sobre discos de dentina por microscopia electrónica de barrido (SEM).
- Medir la posible citotoxicidad de BisBAL NP-Van mediante ensayo de viabilidad celular MTT sobre fibroblastos humanos.

6. ANTECEDENTES

6.1 Endodoncia

El tratamiento endodóntico se ha comparado con una cadena, donde la cadena es tan fuerte como cada uno de sus eslabones individuales, es decir, que se debe considerar que cada uno de los pasos a seguir en el tratamiento endodóntico es de suma importancia y no se le puede hacer menos a ninguno (Cohen, et al 2011). La terapia del conducto radicular brinda la oportunidad de mantener un diente endodónticamente comprometido debido a una infección o trauma en forma y función adecuadas en la cavidad bucal (Shreya, *et al.*, 2021).

6.1.1 Infección del conducto radicular (BioFilm)

El biofilm bacteriano maduro consiste en una multicapa de bacterias adheridas a la superficie incrustado en una matriz polimérica extracelular. Se entiende que ningún mecanismo puede explicar la resistencia general de las bacterias del biofilm a los antimicrobianos, y diferentes mecanismos actúan en concierto dentro de la biopelícula para presentar la biopelícula bacterias con una resistencia considerablemente alta a los antimicrobianos (Wu D, *et al.*, 2014). Uno de los principales componentes del biofilm es la sustancia extracelular polimérica (EPS), que se encarga de las diferentes funciones y formación del biofilm, que es básicamente darle estabilidad estructural, proporcionar las interacciones intracelulares, un reservorio de nutrientes y brindar protección (Wong J, *et al.*, 2021).

Lo más lógico sería pensar que todas las infecciones del conducto radicular se originan por brechas o fisuras coronales en la estructura dental (caries, traumatismo, etc.) o por exposición de las comunicaciones naturales (conductos laterales), el desarrollo de la lesión periapical parecería depender de la contaminación microbiana inicial de las superficies de la dentina (pared del conducto radicular y túbulos dentinarios), una vez la colonización inicial es exitosa, inicia la propagación y consolidación de su naturaleza polimicrobiana con generación de sustancias exopoliméricas, sucesión de especies bacterianas dentro de la creciente comunidad de biofilm con propiedades anaeróbicas que llevan a una colonización crítica (de Paz, *et al.*, 2015).

Las bacterias que tienen acceso a la bolsa periodontal, pueden llegar a invadir otros tejidos como el cemento y la dentina. Esta última, es una de las estructuras radiculares más importantes que permite la invasión bacteriana. La profundidad de penetración de las bacterias dentro de los túbulos dentinarios puede variar y con frecuencia no se puede eliminar con una terapia periodontal mecánica. Dicha invasión bacteriana ocurre comúnmente cuando la dentina está expuesta después de una ruptura en la integridad del cemento durante enfermedad periodontal (Kina, J. R., *et al.*, 2008).

Mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión, se ha logrado observar una biopelícula multiespecífica compleja en los conductos radiculares de la periodontitis apical persistente. *Fusobacterium*, *Corynebacterium*, *Porphyromonas*, *Streptococcus* y *Stenotrophomonas* fueron los géneros más abundantes detectados en muestras intraradiculares de infección persistente. Además, *Pseudomonas spp.*, *Burkholderia spp.* y *Enterococcus faecalis* también se encontraron altamente prevalentes en conductos radiculares con infecciones endodónticas persistentes (Sun X, *et al.*, 2022).

6.1.1.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*), es una bacteria anaerobia facultativa Gram-positiva, que ha sido altamente detectado en la infección refractaria del conducto radicular y la reinfección de los dientes humanos (He X, *et al.*, 2022). Es un organismo persistente que juega un papel importante en la etiología de las lesiones perirradiculares persistentes como infección endodóntica secundaria. Su porcentaje de aparición es alto dentro del conducto radicular y fallas en el tratamiento radicular (STUART, C., *et al.*, 2006). *E. faecalis*, es una de las especies aisladas con mayor prevalencia de conductos radiculares dañados o infectados de dientes primarios y permanentes, puede tener una prevalencia que varía del 10 % al 76 %. *E. faecalis* tiene la capacidad de estar presente dentro de los túbulos dentinarios y se adhieren al colágeno en presencia de suero humano, además pueden sobrevivir a niveles de pH alcalino extremos y períodos prolongados de inanición e incluso pueden resistir

los efectos antimicrobianos de diversos irrigantes endodónticos y medicamentos intraconducto (Beegam KS, *et al.*, 2021).

6.2 Tratamiento endodóntico

El desbridamiento eficaz, la desinfección completa y la obturación tridimensional de todo el sistema de conductos radiculares son requisitos previos para el éxito a largo plazo del tratamiento de endodoncia. La contribución de los microorganismos al inicio y progresión de las enfermedades pulpares y perirradiculares ha sido validada en modelos animales y estudios en humanos por varios autores (Beegam KS, *et al.*, 2021).

6.2.1 Instrumentación mecánica

La conformación incluye el desbridamiento mecánico, la creación de espacio para la administración de medicamentos y la optimización de la geometría del conducto para una obturación adecuada. Se dispone de una amplia gama de instrumentos, tanto manuales como rotatorios, para la preparación del conducto radicular (Cohen, *et al.* 2011).

6.2.2 Medicación intraconducto

Para asegurar una descontaminación predecible del sistema de conductos radiculares, la preparación quimio-mecánica del espacio del conducto radicular a veces se complementa con el uso de medicación intraconducto. Una definición presentada por Mohammadi es que “un medicamento es un agente antimicrobiano que se coloca dentro del conducto radicular entre citas de tratamiento en un intento de destruir los microorganismos restantes y prevenir la reinfección” (Mohammadi, Z., & Dummer, P. M. H. 2011). Dado que el control microbiano del espacio del conducto radicular es fundamental para la resolución de la periodontitis apical, se han investigado intensamente las estrategias de desinfección del conducto radicular, siendo el uso de medicación intraconducto como paso complementario a la preparación quimio-mecánica del espacio del conducto radicular (Meire MA, van der Waal SV, 2022).

6.2.3 Hidróxido de calcio (CaOH₂)

El hidróxido de calcio (CaOH_2) es el medicamento intraconducto más utilizado durante los procedimientos de endodoncia. Su propiedad antibacteriana está generalmente relacionada con la liberación de iones hidroxilo, que produce los efectos letales en las células bacterianas incluyendo la desnaturalización de proteínas y el daño a las membranas citoplasmáticas bacterianas y ADN. Además, es utilizado en múltiples procedimientos como perforaciones, tratamientos de pulpa vital, apexificación, entre otros usos que se ha buscado darle al CaOH_2 mencionadas en el artículo ya mencionado por el autor Z. Mohammadi.

Sin embargo, la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio puede ser inactivado por la dentina, el exudado del área periapical y microbiano. Además, el hidróxido de calcio no elimina las biopelículas de *E. faecalis* del sistema de conductos radiculares (Wu D, *et al.*, 2014). Otra desventaja del uso del CaOH_2 es que reduce significativamente la resistencia a la flexión de la dentina, la micro dureza y la resistencia de la raíz a la fractura debido a que no se deposita la dentina en la pared de la dentina radicular (Shreya, *et al.*, 2021).

En cuanto a pasos finales de un tratamiento de endodoncia cuando se busca eliminar el CaOH_2 , la forma más común es mediante el uso de hipoclorito de sodio (NaOCL), instrumentación mecánica e irrigación final con EDTA al 17%. Sin embargo, se ha demostrado que esta técnica es insuficiente para la eliminación total del CaOH_2 (Savur IG, Ulusoy OI, 2021). De manera que ya para obturar propiamente un conducto, es necesario removerlo, ya que si no se remueve por completo puede traer consigo diferentes consecuencias ya que sus residuos en las paredes del conducto si interactuara por ejemplo con el óxido de zinc y el eugenol aumentaría la fuga apical. Prácticamente evitaría la penetración de los cementos selladores dentro de los túbulos dentinarios (Shi L, *et al.*, 2022). De manera que interfiere negativamente en la interfaz de adhesión con la dentina radicular y/o las propiedades físicas de los selladores a base de resina (Pedrinha VF, *et al.*, 2021).

6.2.4 Pasta triple antibiótica (TAP)

La pasta triple antibiótica es otro medicamento intraconducto ya no tan utilizado, se conforma por una combinación de metronidazol, ciprofloxacina y minociclina que se

tiene comprobada su efectividad para combatir infecciones y para ser usado como medicación intraconducto (Madhukumar M, *et al.*, 2021). Sin embargo, esto no deja que en su gran mayoría cuenta con desventajas como pigmentación en los dientes y una toxicidad de células madre, lo que lo hace para nada utilizable en procedimientos como regeneración endodóntica (Shreya, *et al.*, 2021). Esta pigmentación de la cual se habla, es debido a que dentro de sus componentes que son minociclina, metronidazol y ciprofloxacina, la minociclina es el causante (Yaghmoor RB, *et al.*, 2021). Otras dos desventajas mencionadas en estudios son también que facilita la resistencia bacteriana a los antibióticos y que puede causar reacciones alérgicas (Adigüzel M, *et al.*, 2021).

6.2.5 Pasta doble antibiótica (DAP)

Esta medicación intraconducto es prácticamente la TAP, solo que es libre de minociclina, se ha intentado darle utilidad en endodoncia regenerativa y se ha demostrado que al igual que la TAP, su exposición a largo plazo reduce sus propiedades (Madhukumar M, *et al.*, 2021). Para un tratamiento de regeneración endodóntica, funciona prácticamente igual que la pasta triple antibiótica, ya que ambas tienen alta citotoxicidad y genotoxicidad sobre las células madre (Jamshidi D, *et al.*, 2021).

6.2.6 Mezclas con CaOH₂

Existen ciertos estudios que buscan ayudar o potenciar al CaOH₂, sin embargo, no dejan de tener propiedades que son contraproducentes para su uso como medicación intraconducto. En primer instancia el potencial de las sales metálicas (Ag, Cu y Zn), polímeros/nanopartículas metálicas y clorhexidina (CHX) se consideraron útiles para evaluarse de manera que puedan mejorar la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio (CH) contra *E. faecalis* y *C. albicans*, asociados con infecciones endodónticas persistentes (Sy K, *et al.*, 2021). Así mismo otro estudio buscó desarrollar un biomaterial a base de quitosano con hidróxido de calcio y clorhexidina al 2% para su aplicación en el tratamiento intraconducto y, en consecuencia, disminuir el número de microorganismos en el sistema de conductos radiculares. (Nunes BS, *et al.*, 2021). Ambos materiales incluyen el uso de CHX,

pero se puede prever que existe un riesgo ya que como es medicación intraconducto se puede esperar que interactúe con el NaOCl y se corre el riesgo de la mezcla de estas dos sustancias. Ahora bien, el uso del primero que se mencionó es en pasta, y ya se mencionó la desventaja principal de usar pasta que es que cuando endurece pierde sus propiedades.

6.3 Farmacología

La medicina actual presenta nuevos métodos para evitar la resistencia bacteriana que constantemente incrementa por diferentes motivos. En la literatura actual se busca hacer sinergismo con dos o más elementos de manera que potencien sus efectos y sirvan como complemento uno con otro (Zhang L, et al., 2022). De igual manera Yener Özel, nos presenta un artículo que habla de sinergismo con aceites naturales y antibióticos, mencionando incluso Linezolid, y prácticamente explica esta parte importante de buscar la manera de evitar la resistencia a los antibióticos utilizando elementos sinérgicos que sean incluso diferente a lo usual (Özel Y, et al., 2022).

6.3.1 Antibióticos

Puesto que en los pacientes sometidos a endodoncia con una periodontitis apical las bacterias desempeñan un papel significativo, la incidencia de una infección o de una reagudización tras realizar un tratamiento endodóntico tiene una importancia especial para estos odontólogos especialistas. Para prevenir la aparición de infecciones aparentemente tendría sentido efectuar un tratamiento profiláctico con antibióticos, pero en la práctica su utilización puede llegar a ser objeto de controversia a causa de varias razones (Cohen, et al 2011). La administración local de antibióticos puede resultar en algunos efectos secundarios negativos (resistencia bacteriana, toxicidad celular, entre otros), lo que promueve a la búsqueda diferentes métodos de administración de fármacos eficaces y biológicamente seguros con la capacidad de penetrar el sistema de conductos radiculares de los tejidos pulpaes infectados (Ribeiro JS, et al., 2022). Por la misma razón de que actualmente existe una alta resistencia a medicamentos, además de utilizar diferentes maneras o estrategias para usar los fármacos, constantemente se busca obtener nuevos e

incluso fármacos que sean más efectivos contra este tipo de bacterias que logran ser resistentes (Torjani A, *et al.*, 2022).

6.3.1.1 Vancomicina

La vancomicina es un antibiótico utilizado contra bacterias Gram-positivas, y tiene un alto porcentaje de efectividad, aproximadamente del 97.37% (Alam M, *et al.*, 2022). Su mecanismo de acción consiste en una ligadura química dirigida por peptidoglicano (PGCL) entre la vancomicina que contiene alquino y un polímero catiónico marcado con azida. El primero se une al peptidoglicano e inhibe el entrecruzamiento de peptidoglicano, mientras que el segundo interfiere en la integridad de la membrana bacteriana (Jiang F, *et al.*, 2022). La principal razón para el uso de Vancomicina en este estudio, es porque como ya se mencionó anteriormente, ya existe una gran resistencia a antibióticos para muchos de los cuales se han utilizado por mucho tiempo, de manera que surgen constantemente nuevos medicamentos. La vancomicina ha demostrado en diferentes estudios, que bacterias Gram-positivas tienen sensibilidad a este medicamento, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* que ha demostrado resistencia ante otros antibióticos (Górecki I, *et al.*, 2023). Se ha comprobado que este antibiótico es muy bueno para trabajar en colaboración con otros medicamentos, por ejemplo, en conjunto con la gentamicina con MIC de 4 µg/mL y vancomicina con MIC de 256 µg/mL contra *Enterococcus faecalis* mostró actividad antibacteriana. (Adeniji OO., *et al.*, 2023).

6.4 Nanotecnología

Las nanopartículas han demostrado ser portadores efectivos para una amplia variedad de terapias génicas (Cabral-Romero C, *et al.*, 2020). Es una nueva disciplina que ofrece la oportunidad de desarrollar “medicamentos inteligentes” con alta selectividad, administración controlada y pocos efectos secundarios adversos no graves (Torres-Betancourt JA, *et al.*, 2022).

6.4.1 BisBAL NP

El bismuto tiene muy baja solubilidad en agua, se puede quelar con compuestos que contienen grupos hidroxilo y sulfhídrico para producir agua soluble y complejos

biocompatibles. Las nanopartículas de bismuto con funcionalidad lipofílica (por ejemplo, dimercaptopropil, BAL), inhibe rápidamente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, y parece ser que es un agente antimicrobiano más efectivo con menor MIC que los iones de plata o las nanopartículas de plata (Badireddy, A. R., *et al.*, 2014). De manera que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de BisBAL NPs contra microorganismos orales patógenos fue de 5 a 10 μM . Y estudios de citotoxicidad revelaron que los NPs de BisBAL no eran citotóxicos para células epiteliales y sanguíneas humanas en contraste con nanopartículas de plata u oro (Martínez-Martínez MA, *et al.*, 2019). Otra concentración posible utilizada de manera que logró una sinergia con un cemento sellador a base de resina (AH Plus) fue de 10 50 μM (Torres-Betancourt JA, *et al.*, 2022). Una ventaja de utilizar BisBAL es esta capacidad que tiene de interactuar con otras sustancias y potenciar sus actividades antimicrobianas y antibiofilm, o incluso proporcionarlas como lo hizo en un estudio en el que a un cemento MTA se cargó con estas nanopartículas teniendo resultados favorables (Hernandez-Delgadillo R, *et al.*, 2017). La inhibición del crecimiento inducida por BisBAL NP depende de la dosis y el mecanismo de acción de BisBAL NP, puede incluir la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y un efecto genotóxico en el ADN genómico de las células de cáncer de mama (Hernandez-Delgadillo R, *et al.*, 2018). Y una vez más hablamos de que no parece tener citotoxicidad, siendo un material biocompatible, propiedad importante para poder darle el uso en la cavidad oral (Rene HD, *et al.*, 2016).

6.5 Hidrogel

Ya han existido estudios que prueban que el uso de un hidrogel, es una estrategia muy buena para combatir bacterias, específicamente, infecciones endodónticas por lo que es un sistema muy atractivo e innovador para el uso de medicación intraconducto. Por ejemplo, un estudio realizado por Juliana S. Ribeiro, *et al.* Demostró que el uso de un hidrogel cargado con antibióticos sobre bacterias patógenas y difíciles de eliminar, era una estrategia que obtuvo resultados importantes con buenos valores de inhibición, aunque menciona que dependía hasta cierto punto del tipo de antibiótico(s) usado(s), así como el tipo de bacterias probadas (Ribeiro JS, *et al.*, 2022).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Síntesis y caracterización del hidrogel BisBAL NPs-Van

Para su elaboración se utilizó clorhidrato de vancomicina inyectable de 500 mg (Novartis, México), BisBAL NPs (sintetizadas por método coloidal y previamente caracterizadas por SEM), carbopol y trietanolamina obtenidos por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la UANL. Un stock de Vancomicina de 1 mM en líquido fue preparado solubilizando en agua bidestilada la vancomicina de 500mg en 10mL. Para obtener un hidrogel de 1mM (1000 μ M), primero la Vancomicina se diluyó en carbopol tomando 134.95 μ L de Vancomicina y 9,865.05 μ L de carbopol (Sigma-Aldrich, StL,USA), de manera que se obtuvieron 10 ml de Vancomicina a 1mM (1000 μ M). Las BisBAL NPs en su stock están a una concentración de 50,000 μ M, de manera que se tomó 40 μ L y se diluyó en carbopol 9,960 μ L para obtener 10 ml de BisBAL NPs en una concentración de 1mM (1000 μ M). Ambos reactivos se colocaron en un recipiente donde se agregaron 200 μ L de trietanolamina y se comenzó a mezclar hasta obtener una sustancia viscosa (gel). El pH del hidrogel BisBAL NP-Van fue medido mediante el uso del potenciómetro. Fue almacenado a temperatura ambiente, ya que no requiere de refrigeración/congelación.

7.2 Toma de aislados de pacientes de *E. faecalis* y preparación de discos de dentina

7.2.1. Toma de muestras para aislamiento de *E. faecalis* a partir de pacientes con infección endodóntica

Se tomaron muestras de los conductos radiculares siguiendo estrictas medidas asépticas. Se eliminaron las biopelículas supragingivales mediante raspado y limpieza con piedra pómez, se aplicó un dique de goma y se eliminaron las caries y/o las restauraciones coronales con irrigación salina estéril. Antes y después de la preparación de la cavidad de acceso, el campo operatorio (dique, clamp y diente) se desinfectó mediante un protocolo de desinfección de 2 pasos con el uso secuencial de peróxido de hidrógeno al 6 % e hipoclorito de sodio al 2,5 % (NaOCl). A continuación, se usó tiosulfato de sodio al 10 % para inactivar el NaOCl y se

tomaron muestras de control de esterilidad usando puntas de papel estériles frotadas contra el ángulo cavosuperficial de la cavidad de acceso y se colocaron en 1 mL de medio de cultivo líquido estéril de tripticaseína de soya y se incubó a 37°C durante 24h.

7.2.2 Aislamiento de *E. faecalis* por MALDI Biotyper system.

Los sistemas MALDI Biotyper proporcionan identificación de alta velocidad, alta confianza y clasificación taxonómica de bacterias, levaduras y hongos. La clasificación y la identificación se basan en huellas digitales proteómicas utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF de alto rendimiento. Los aislados fueron identificados por desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas de por tiempo de vuelo (MALDI-TOF) espectrometría de masas (sistema Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se depositó una colonia de cultivos cultivados en placas de agar sangre e incubados a 37°C durante 24h en los pocillos de una placa de destino de acero inoxidable de 86 puntos (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Posteriormente se adicionó 1µL de ácido fórmico al 70% y luego del secado se agregó 1 µL de solución de matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich, St, MO, USA). A continuación, la placa se introdujo en el equipo donde se analizó con el software MALDI Biotyper 3.0 para comparar la base de datos de perfiles de espectros.

7.2.3 Obtención de los discos de dentina

La selección de los pacientes fue de manera aleatoria y se llevó a cabo en el Posgrado de Endodoncia, Facultad de Odontología de la UANL, Monterrey, Nuevo León, México, con indicación de tratamiento de conducto fueron incluidos en este estudio. Cada paciente aportó 1 diente. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: solo dientes con una sola raíz y un solo canal presentando pulpas necróticas confirmadas por una respuesta negativa a pruebas de sensibilidad pulpar, paredes intactas de la cámara pulpar y evidencia clínica y radiográfica de periodontitis apical asintomática. Exclusión Los criterios incluyeron los siguientes: presencia de lesiones cariosas macroscópicas o fractura de raíz/coronilla,

tratamiento endodóntico previo, presencia de síntomas, terapia antibiótica administrada dentro de los 3 meses previos, y bolsas periodontales de más de 4 mm de profundidad. El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de investigación de la UANL, y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes participantes.

7.2.4 Activación y crecimiento de microorganismos

Los microorganismos empleados en este estudio fueron adquiridos en la American Type Culture Collection (ATCC). La activación y crecimiento de *Enterococcus faecalis* (ATCC; 11420) se realizó en medio tripticaseína de soya (TSB) (BD Difco™, Sparks MD, USA) a 37°C en condiciones aeróbicas. Los microorganismos de aislado clínico de paciente con infección endodóntica fueron empleados para simular el efecto clínico. Los microorganismos fueron contados empleando una cámara de Neubauer para el desarrollo de los ensayos antimicrobianos y antibiofilm.

7.3 Actividad antimicrobiana de BisBAL NP-Van mediante ensayos de difusión en disco

La actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con BisBAL NPs-Van fue determinada mediante el ensayo de difusión en disco. 100 µL del cultivo bacteriano (0.5 Mcfarland) fueron esparcidos en placas Petri con agar TSB empleando un hisopo de algodón estéril. Luego se perforó el agar para generar pozos de 5mm de diámetro. El hidrogel BisBAL NPs-Van fue incrustado en uno de los pozos de agar, así como los controles positivos de clorhexidina 0.12% (Ultradent, South Jordan, UT). Se incubó a 37°C en condiciones aeróbicas 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. Adicionalmente se utilizó el ensayo de viabilidad celular MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro] (Biotium, Hayward, CA) (Mosmann 1983; Liu et al. 1997). 1X10⁴ células fueron inoculadas en 100 µl de medio TSB en placas de poliestireno de 96 pozos. Como control de crecimiento se emplearon microorganismos cultivados en medio TSB sin ninguno inhibidor. Clorhexidina al

0.12% (Ultradent, South Jordan, UT) fue utilizada como inhibidor positivo. 1000 μ M del hidrogel con BisBAL NPs-Van se empleó para interferir con el crecimiento microbiano. La placa de 96 pozos fue incubada a 37 °C durante 18 horas. 10 μ l de MTT fueron añadidos a cada pozo, la placa se protegió contra la luz y se incubó a 37 °C, por 2h. 200 μ l de Dimetilsulfoxido (DMSO) fue añadido para disolver el MTT reducido. El número de células vivas fue determinado por un lector de absorbancia de microplaca (Biorad, Philadelphia, PA) a 570nm. El experimento fue repetido tres veces y la densidad óptica medidas fue analizada por estadística descriptiva.

7.4 Ensayo de viabilidad celular *Live/dead*

La actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van N se analizó empleando el kit de live/dead (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit; Thermo Fisher Scientific; USA) y microscopia de fluorescencia. Para evaluar potencial antimicrobiano del hidrogel contra *E. faecalis* solo o aislado clínico siguiendo el protocolo anteriormente descrito con una ligera modificación. En general se siguió la siguiente estrategia: se hizo crecer el biofilm de *E. faecalis* o aislado clínico en placas de poliestireno de 48 pozos durante 48hrs, haciendo un recambio del medio de cultivo a las 24hrs agregando también glucosa. Después a las 24hrs se agregó el hidrogel cargado con vancomicina y BisBAL NPs (1000 μ M c/u), CHX al .6% y suero fisiológico como controles positivos y negativos. Se dejó actuar por 24hrs. Se incubó la placa a 37°C durante 48h y 5 días en oscuridad. Posteriormente se analizó el biofilm remanente se observó mediante el uso del sistema EVOS empleando los filtros FITC y rodamina.

7.5 Actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre el biofilm de *E. faecalis* aislado de paciente sobre discos de dentina

Premolares mandibulares humanos de una sola raíz con ápices maduros fueron recolectados para este estudio previo consentimiento informado y aprobación de los pacientes. La corona y la porción apical de los dientes se seccionaron utilizando una fresa de diamante. Luego, los dientes se seccionaron verticalmente a lo largo del plano sagital medio en 2 mitades, y se extrajo el cemento de la superficie de la raíz usando una fresa de diamante. 32 discos de dentina se prepararon en secciones

del tamaño de 4x4x1 mm (ancho, largo y altura, respectivamente). Se eliminó el barrillo dentinario colocando las secciones de dentina en un baño ultrasónico de hipoclorito de sodio al 5,25% y EDTA al 17% para 4 minutos cada uno. Finalmente, todas las secciones de dentina se enjuagaron con agua estéril. Agua durante 1 minuto y esterilizado en autoclave durante 60 minutos (BHI) caldo. *E. faecalis*, recolectado de los aislados de pacientes, se sembró en caldo BHI suplementado con agar al 1,5 % (peso/vol) (Biosharp, Hirono, Japón) e incubo a 37° C durante 24 horas. Una sola colonia de *E. faecalis* de una placa de agar BHI se recogió y se suspendió en caldo BHI estéril a 37° C Las muestras de dentina esterilizadas se colocaron en una placa de 48 pozos que contienen 100 mL de suspensión de *E. faecalis* y 300 mL de caldo de medio de cultivo. Las muestras se incubaron en condiciones anaerobias a 37° C durante 5 días. El caldo BHI fresco se reemplazó cada dos días para eliminar células muertas y asegurar la viabilidad bacteriana. Después de la incubación, las muestras se retiraron de la placa de 48 pozos con un enjuague aséptico y suavemente con solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) para eliminar el medio de cultivo y las bacterias no adherentes. Cuatro secciones de dentina seleccionadas al azar fueron observadas por una emisión de campo microscopio electrónico de barrido (CIMA) para verificar la presencia de biopelículas de *E. faecalis* en las superficies de dentina.

7.6 Ensayo de viabilidad celular

7.6.1 Cultivo celular

La línea celular de fibroblastos gingivales humanos fue amablemente donada por el Dr. Higinio Arzate (Posgradgo-FO-UNAM). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco/F12 de Ham (DMEM/F12) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se adicionaron antibióticos para evitar posible contaminación al medio (Penicilina 100U/ml, Estreptomina 100 µg/mL y 0.25 µg/mL de anfotericina B (Sigma Aldrich Corp). Las células se crecieron en las matraces de cultivo celular (Corning Inc, NY, USA) a 37°C y 5% de CO₂. Las células conformando una monocapa confluyente se recolectaron raspando, se lavaron 3 veces con PBS 10 mM pH 7.4 y se contaron con un hemocitómetro.

7.6.2 Citotoxicidad del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre fibroblastos humanos

La posible citotoxicidad del hidrogel BisBAL NPs-Van se evaluó sobre fibroblastos humanos mediante el ensayo de viabilidad celular MTT^{11,12} (Life Technologies Corporation, Oregon, USA). Las células fueron 24h-expuestas al hidrogel de BisBAL NPs-Van en un rango de concentración de 1-125 μ M. 600 μ M de clorhexidina (Ultradent, South Jordan, UT) fueron utilizados como control comercial de inhibición. Células expuestas a ningún fármaco, se utilizaron como control de crecimiento. El tratamiento se terminó lavando las células con PBS y tratadas con MTT fue (10 μ l/pozo, 30 min, 37°C, 5% de CO₂) siguiendo las instrucciones del proveedor. La absorbancia se midió a 570 nm con un lector de absorbancia de microplaca (Biotek, Winooski, vermont, USA). Y se normalizo a valores de 600 nm (longitud de onda de referencia). La viabilidad celular se expresó como porcentaje con la prueba realizada por triplicado.

7.7 Análisis estadístico

Análisis de varianza (ANOVA) fue utilizada para evaluar los efectos de los tratamientos, y la prueba HSD de Tukey para las diferencias entre los tratamientos y los grupos de control. Se consideraron todas las pruebas estadísticas con nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización del hidrogel BisBAL NPs-Van

La síntesis del hidrogel BisBAL NPs-Van se desarrolló en relación 1:1 y empleando una concentración final de 1mM (1000 μ m) de Vancomicina y BisBAL NPs. Las BisBAL NPs fueron previamente sintetizadas por método coloidal y caracterizadas por SEM mostrando su morfología típica circular, con 24 nm de tamaño promedio y distribución homogénea (Figura 1A). El hidrogel mostro una apariencia transparente y consistencia viscosa (gel), que fácilmente se colocó en una jeringa de 10 ml, y fluye fácilmente a través de la jeringa permitiendo su aplicación (Figura 1B). Al ser un hidrogel biodegradable no requiere retirarse ya que el agua se evapora permitiendo la liberación de los principios activos en el sitio de aplicación permitiendo un efecto localizado y de más efectividad. No presenta sabor y no requiere de refrigeración para su conservación (será a temperatura ambiente), no es sensible a la luz y cuenta con un pH de 7.5.

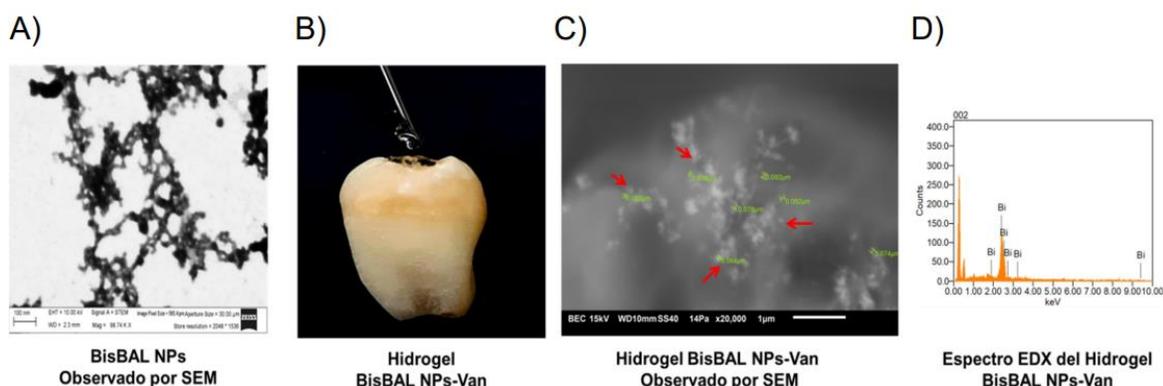


Figura 1. Caracterización del hidrogel BisBAL NPs-Van por microscopia electrónica de barrido (SEM). A) BisBAL NPs observadas por microscopia electrónica de barrido (SEM) donde se ilustra forma, tamaño y distribución. B) Imagen que ilustra el color y viscosidad del hidrogel BisBAL NPs-Van a través de la jeringa mostrando su fluidez para colocación intraconducto. C) micrografía de SEM observando la presencia y distribución de las BisBAL NP embebidas dentro del hidrogel. D) Espectro EDX-SEM que muestra la composición elemental química de lo que muestra la micrografía de SEM, identificando la presencia específica de bismuto.

8.2 Aislamiento de *E. faecalis* a partir de pacientes con infección endodóntica

Mediante el uso de MALDI Biotyper system se pudo obtener el aislado específico de *E. faecalis* a partir de paciente con infección endodóntica. En la figura 2 se muestra el tipo de colonia característica de *E. faecalis*; blanquecina, redonda en agar sangre después de ser incubada por 24h a 37°C (Fig. 2A). El espectro de masas correspondiente exclusivamente a *E. faecalis* se muestra en la figura 2B, evidenciando la especificidad del género y especie bacteriana de *E. faecalis*.

A)



B)

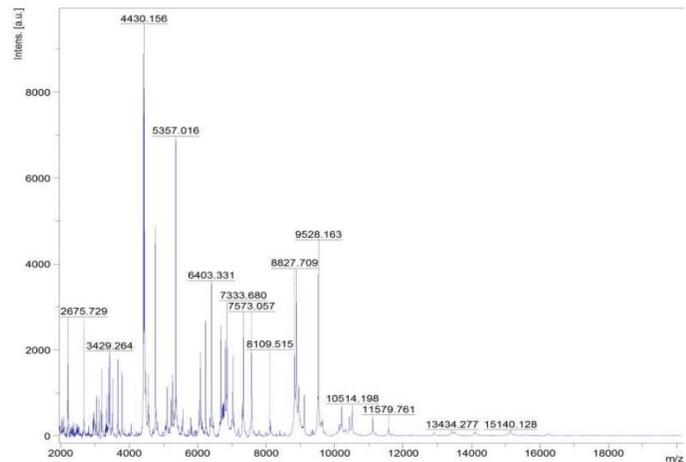


Figura 2. Aislamiento de *E. faecalis* a partir de pacientes con infección endodóntica. A) Imagen que ilustra forma, tamaño y color de colonia de *E. faecalis* aislado de paciente con infección endodóntica por MALDI Biotyper system. B) Espectro de masas que identifica de forma específica a *E. faecalis* con una puntuación mayor a 2.300 obteniendo una identificación a nivel de especie confiable.

8.3 Actividad antimicrobiana de BisBAL NPs-Van mediante ensayos de difusión en disco

La actividad antimicrobiana en ensayos de difusión en disco, donde inicialmente se probó el hidrogel contra *E. faecalis* ATCC 11420 (Figura 3), BisBAL NPs-Van a 1000 μm mostró un gran halo de inhibición después de un tiempo de exposición de 24 hrs. visualmente incluso más grande que la CHX a .12%. En la figura 4 se realizó el mismo ensayo, pero con *E. faecalis* aislado de pacientes, donde BisBAL NPs-Van mostró un excelente potencial antimicrobiano considerablemente mayor a utilizar BisBAL NPs solas comprobado en la Tabla 1, donde los promedios de los halos de

inhibición para BisBAL NPs-Van fueron de ± 30 mm y de BisBAL NPs ± 23.45 . Curiosamente la Vancomicina no reveló nada de actividad antimicrobiana en este segundo ensayo con *E. faecalis* aislado de pacientes.

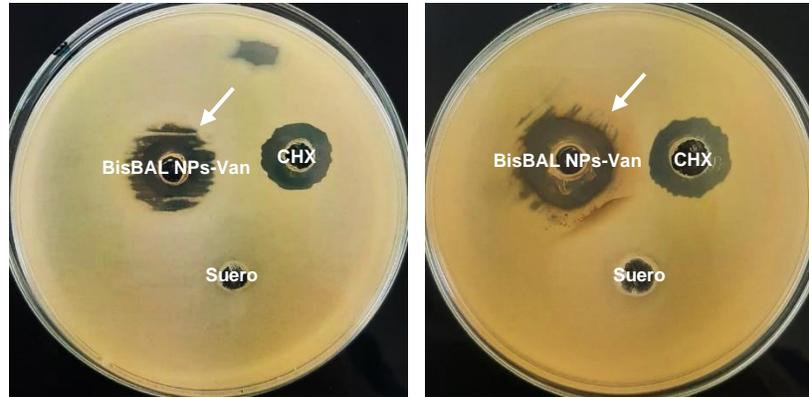


Figura 3. Ensayo antimicrobiano donde se muestran los halos de inhibición de los reactivos que se utilizaron contra *E. faecalis* ATCC 11420 utilizando el hidrogel BisBAL NPs-Van a 1000 μm (señalado por la flecha), CHX al .12% y suero fisiológico.

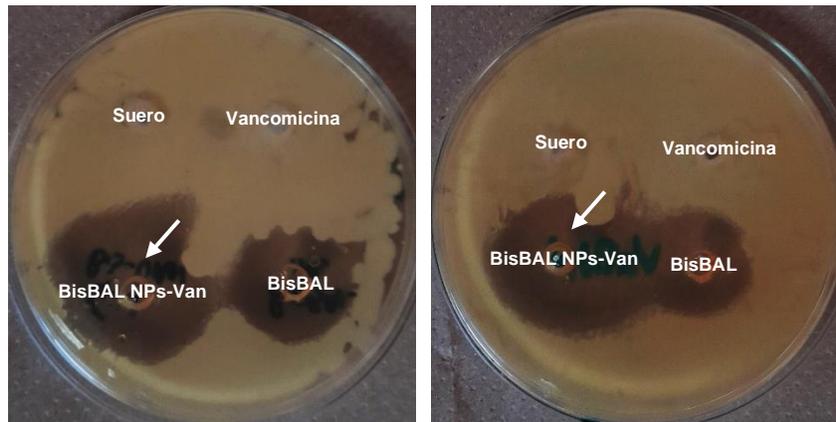


Figura 4. Ensayo antimicrobiano donde se muestran los halos de inhibición de los reactivos que se utilizaron contra *E. faecalis* aislado de pacientes, utilizando el hidrogel BisBAL NPs-Van a 1000 μm (señalado por la flecha), vancomicina y BisBAL por individual a 1000 μm cada uno, y suero fisiológico.

REACTIVOS	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3
Suero	0 mm	0 mm	0 mm
Vancomicina	0 mm	0 mm	0 mm
BisBAL NPs	22.033	24.666	23.666
VABIN	31.466 mm	32.266	26.3

Tabla 1. Ensayo antimicrobiano donde se muestran los promedios del halo de inhibición en milímetros en 3 muestras con suero, vancomicina a 1000 μm , BisBAL NPs a 1000 μm , y el hidrogel BisBAL NPs-Van a 1000 μm .

Con el objetivo de evaluar la estabilidad del hidrogel BisBAL NPs-Van versus tiempo de almacenamiento se midió la actividad antimicrobiana cada semana durante 6 semanas. El hidrogel BisBAL NPs-Van no modifico su apariencia, ni su pH y la actividad antimicrobiana se mantuvo estable a lo largo de las 6 semanas que fue analizado (Figura 4).

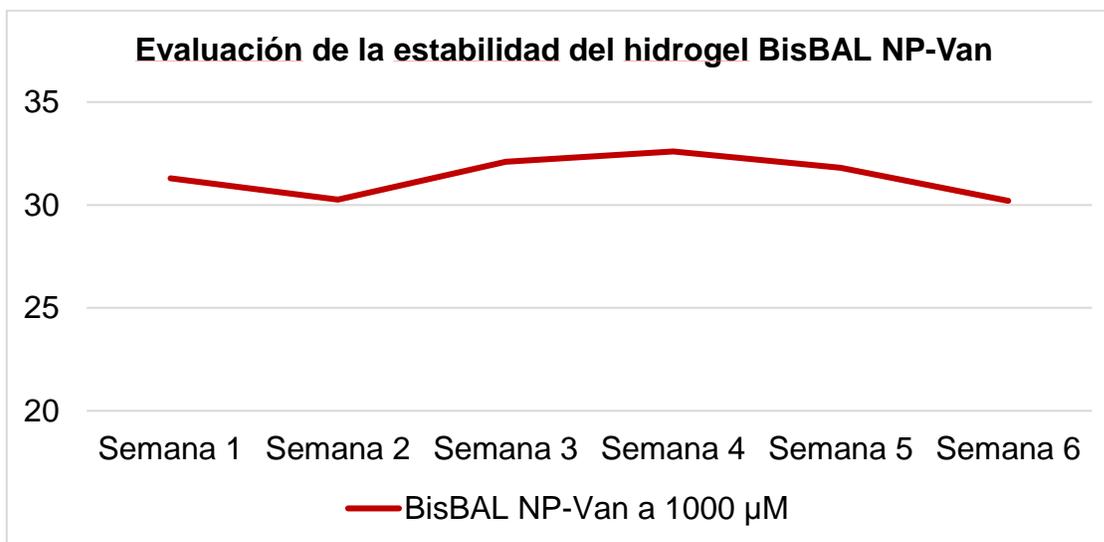


Figura 5. Evaluación de la estabilidad del hidrogel BisBAL NPs-Van. La actividad antimicrobiana del hidrogel se analizó durante 6 semanas con el objetivo de evaluar su estabilidad almacenado a temperatura ambiente.

Con el objetivo de evaluar nuevamente la misma propiedad (actividad antimicrobiana) del hidrogel BisBAL NPs-Van, pero empleando una metodología diferente en este caso ensayo de viabilidad celular MTT (que posee una mayor sensibilidad que los de difusión en disco) para garantizar la veracidad de los

resultados. La figura 5 muestra que 24h-exposicion a 37°C el hidrogel BisBAL NPs-Van redujo 94.5% del crecimiento de *E. faecalis* en contraste con un 96.6% de clorhexidina y 92% de NaOCl al 2.5% ($p < 0.0001$) (Fig. 5). El control negativo con suero fisiológico fue tomado como referencia de 100% de crecimiento bacteriano. El gel vacío sin nanopartículas ni antibiótico no inhibió por sí solo el crecimiento microbiano, descartando cualquier efecto del vehículo. Al realizar la cuantificación de bacterias mediante la lectura de placas, se muestra en la Gráfica 2, que BisBAL NPs-Van tuvo un excelente resultado en cuanto a la cantidad de bacterias que quedaron vivas en comparación incluso con la CHX, teniendo una cantidad de ± 26.5 total de bacterias vivas para BisBAL NPs-Van y ± 41.4 para CHX.

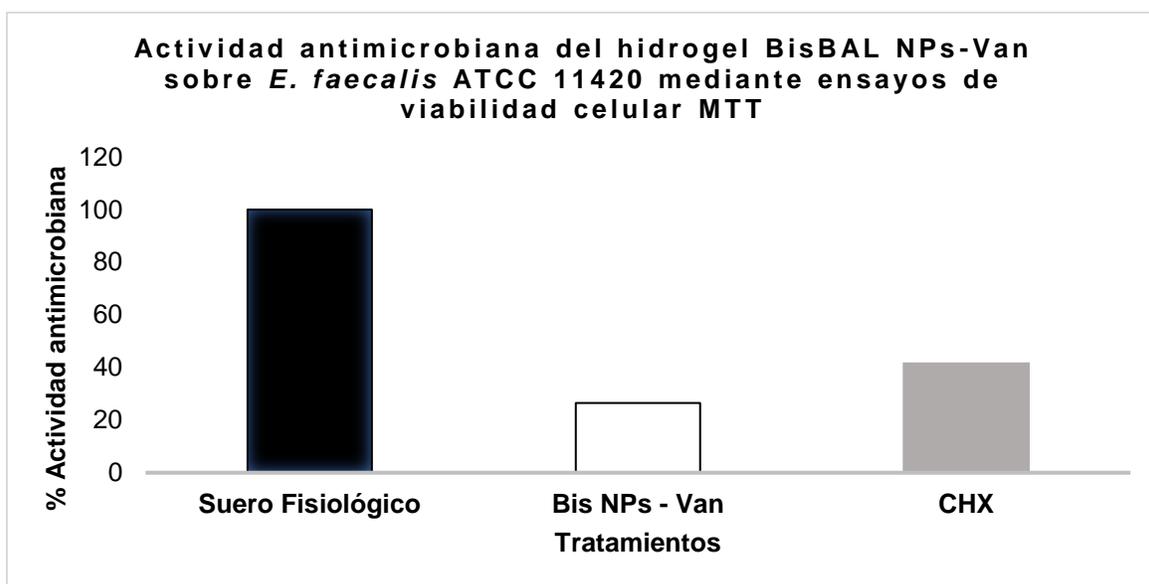


Figura 6. Conteo bacteriano en una placa de 48 pozos, donde se inoculo por 48 hrs *E. faecalis* ATCC 11420 y se dejó BisBAL NPs-Van 1000 μm , suero fisiológico y CHX .6% por 24 hrs.

Actividad antimicrobiana del hidrogel BisBAL NP-Van sobre *E. faecalis* aislado de paciente mediante ensayos de viabilidad celular MTT

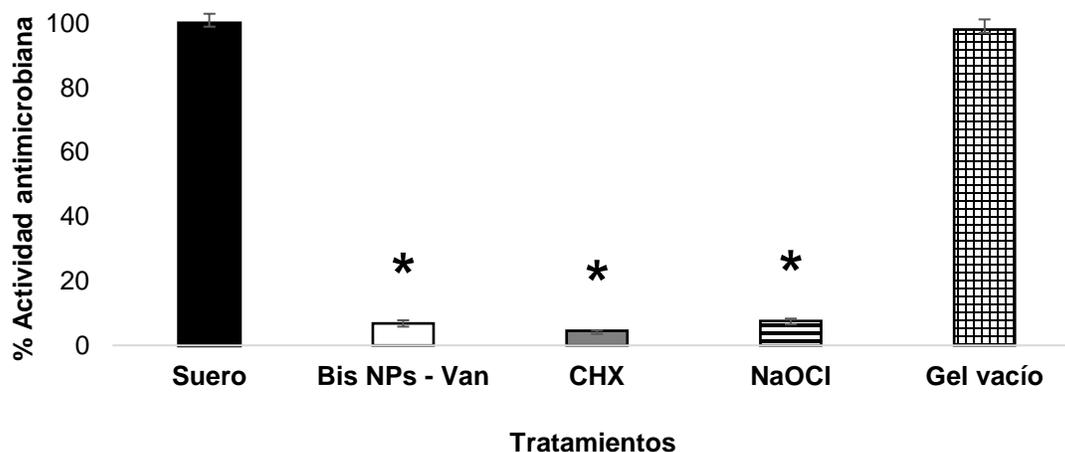


Figura 7. Evaluación del efecto antimicrobiano del hidrogel BisBAL NPs-Van mediante ensayo de viabilidad celular MTT. Un cultivo bacteriano (0.5 McFarland) de *E. faecalis* fue expuesto solo a suero (control de crecimiento) y a 1mM del hidrogel BisBAL NPs-Van, 0.12 % de clorhexidina (600 μ M) y NaOCl al 2.5% por 24h; 37°C y la absorbancia se midió a 570 nm con un lector de absorbancia de microplaca (Biotek, Winooski, Vermont, USA). El Gel Bis NPs-Van mostró reducción del crecimiento en comparación con el grupo control (suero) ($p < 0.0001$). Las barras de error indican la media \pm DS. Asterisco (*) indica diferencias estadísticas $\alpha = 0.05$.

8.4 Actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van mediante ensayo de Live/dead y microscopia de fluorescencia

Una vez estudiada con profundidad la actividad antimicrobiana, se analizó la propiedad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van ya que su utilidad real radica en el potencial de erradicar el biofilm intraconducto de *E. faecalis*. Un cultivo bacteriano (0.5 McFarland) de *E. faecalis* aislado de paciente se inoculó una placa de 48 pozos por 5 días para permitir la formación del biofilm. Una vez formado, el biofilm de *E. faecalis* fue expuesto al hidrogel BisBAL NP-Van 1mM, 0.12% Clorhexidina (600 μ M) y NaOCl al 5.25% durante 7 días. Al observar mediante microscopia de fluorescencia se encontró que el hidrogel BisBAL NPs-Van removió todo el biofilm de *E. faecalis* aislado de paciente (Figura 6). Clorhexidina e NaOCl mostraron

resultados muy similares después de los 7 días de tratamiento. Este resultado sugiere fuertemente que el hidrogel BisBAL NPs-Van puede contribuir al desprendimiento del biofilm intraconducto con eficacia comparada con los tratamientos convencionales. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia a través del ensayo de live and dead para observar el efecto del gel sobre *E. faecalis* ATCC 11420 con un tiempo de incubación de 72hrs. y aislado de pacientes con un tiempo de incubación de 5 días. En las primeras imágenes (Figura 4) se puede ver un muy buen efecto del hidrogel sobre *E. faecalis* ATCC 11420 donde se observa una gran cantidad de bacterias muertas hasta cierto punto mejor que las imágenes de la CHX.

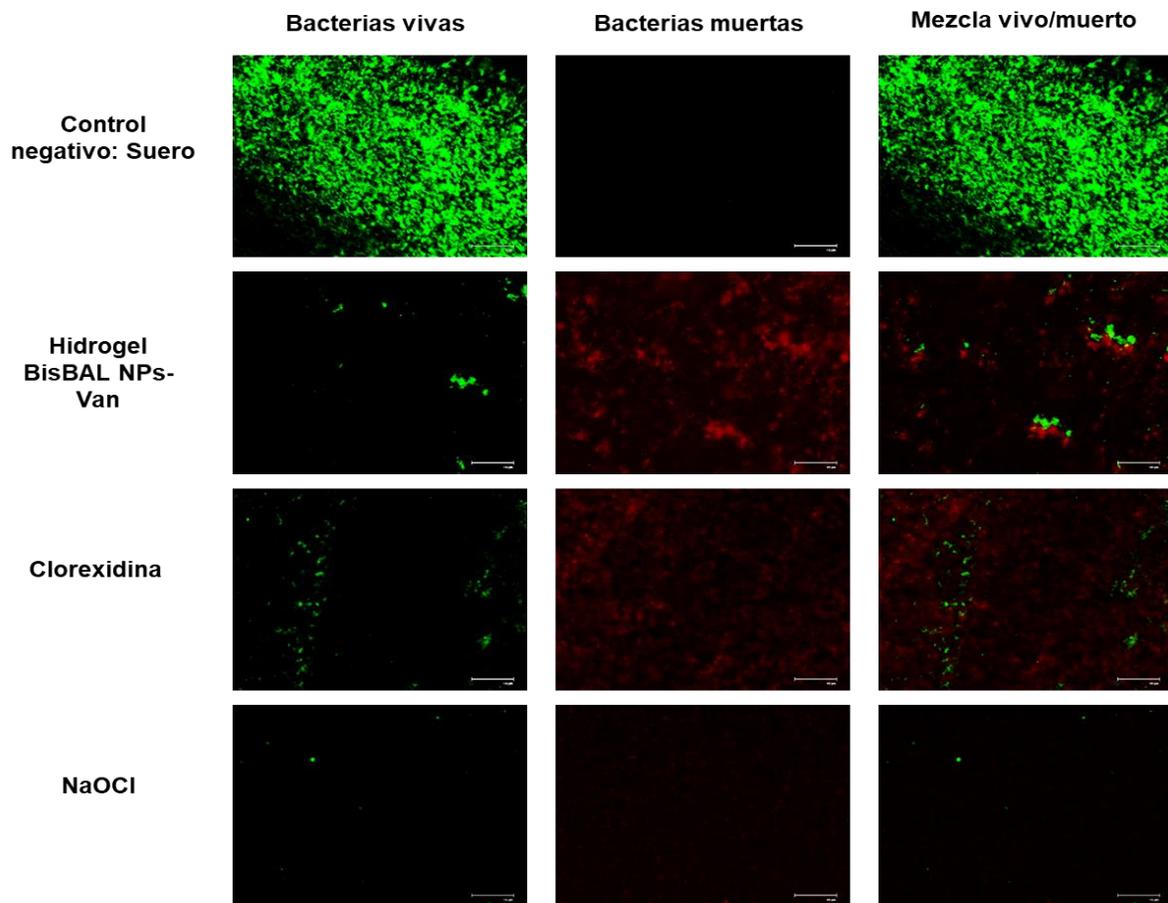


Figura 6. Actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van mediante ensayo live/dead y microscopia de fluorescencia. Un cultivo bacteriano (0.5 McFarland) de *E. faecalis* aislado de paciente se inoculo una placa de 48 pozos por 5 días para permitir la formación del biofilm. Una vez formado, el biofilm de *E. faecalis* fue expuesto al hidrogel BisBAL NP-Van 1mM, 0.12% Clorhexidina (600 μ M) y NaOCl al 5.25% durante 7 días. El biofilm remanente

fue observado por microscopia de fluorescencia con los filtros FITC y CY3. La barra indica 5 μ m.

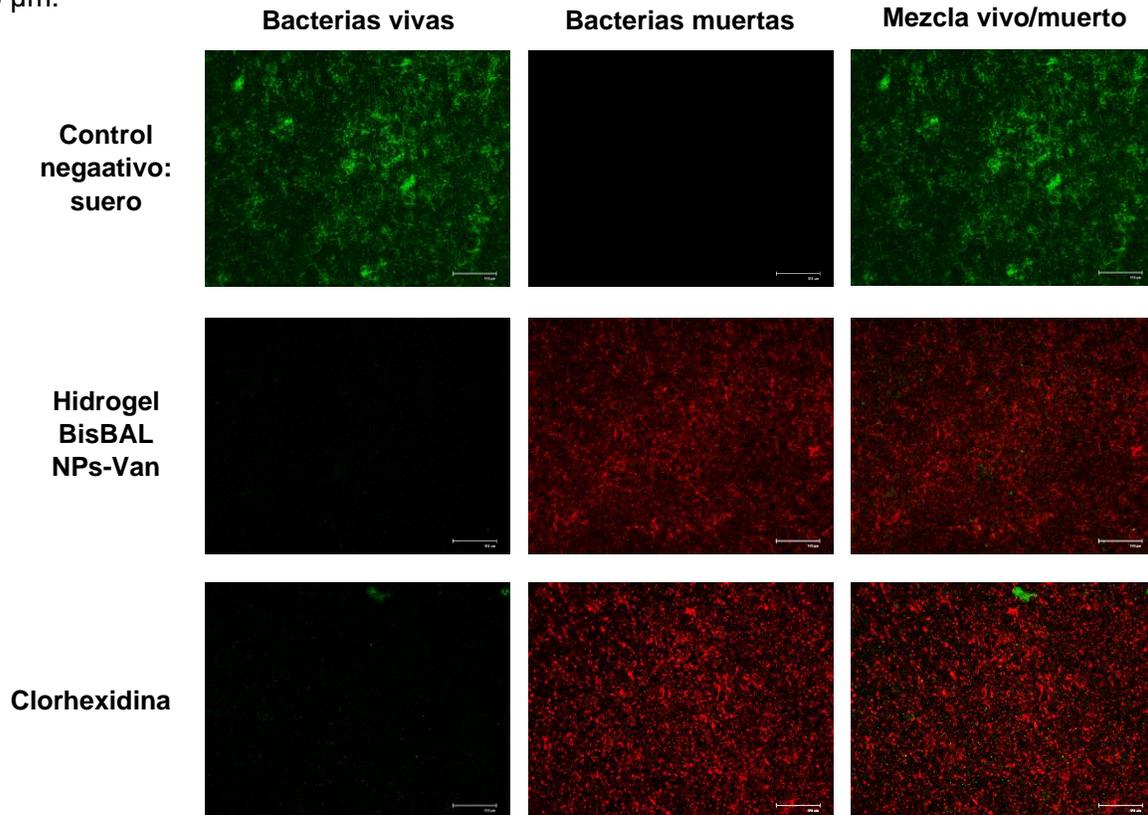


Figura 5. Un biofilm de *E. faecalis* ATCC 11420 en una placa de 48 pozos incubado por 48 hrs. fue tratado con suero fisiológico, VABIN 1000 μ m, suero fisiológico y CHX al .6%, donde se dejaron los reactivos por 24 hrs.

8.5 Actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre el biofilm de *E. faecalis* aislado de paciente sobre discos de dentina por microscopia electrónica de barrido (SEM)

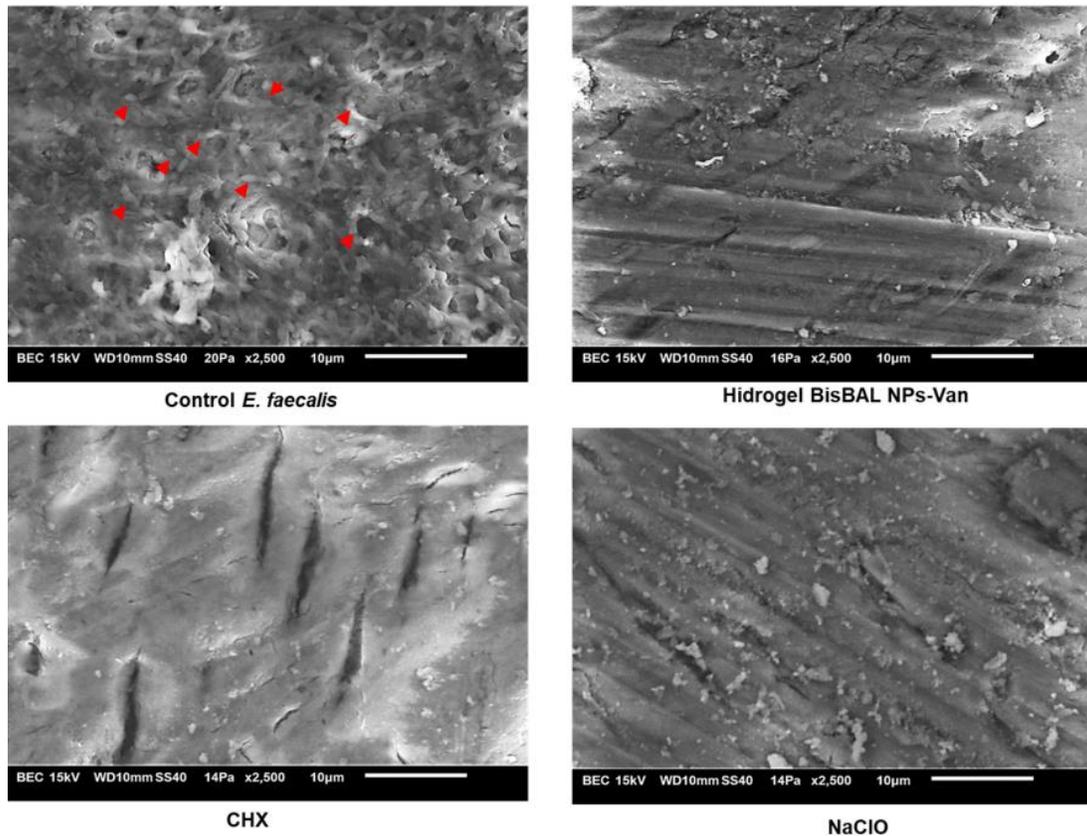


Figura 6. Actividad antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre el biofilm de *E. faecalis* aislado de pacientes sobre discos de dentina por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las flechas rojas indican la presencia de *E. faecalis*.

8.6 Citotoxicidad del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre fibroblastos humanos

Todas las propiedades antimicrobianas y antibiofilm del hidrogel BisBAL NPs-Van no servirían si fuera tóxico y no pudiera ser aplicado en pacientes. Para evaluar su posible citotoxicidad se emplearon fibroblastos gingivales humanos (donación del Dr. Higinio Arzate; Posgrado de la Facultad de Odontología-UNAM). Se analizó un rango de concentraciones de 1-125 μM y empleando 600 μM de clorhexidina como control positivo de citotoxicidad. Los resultados obtenidos muestran que se conserva alrededor de 80% de viabilidad celular post 24h-exposición al hidrogel BisBAL NPs-Van ($p < 0.0001$) (Figura 8). En contraste clorhexidina redujo el crecimiento celular en un 98% ($p < 0.0001$) (Fig. 8). Estos resultados muestran que, a diferencia de clorhexidina, el hidrogel BisBAL NPs-Van no es citotóxico para los fibroblastos humanos.

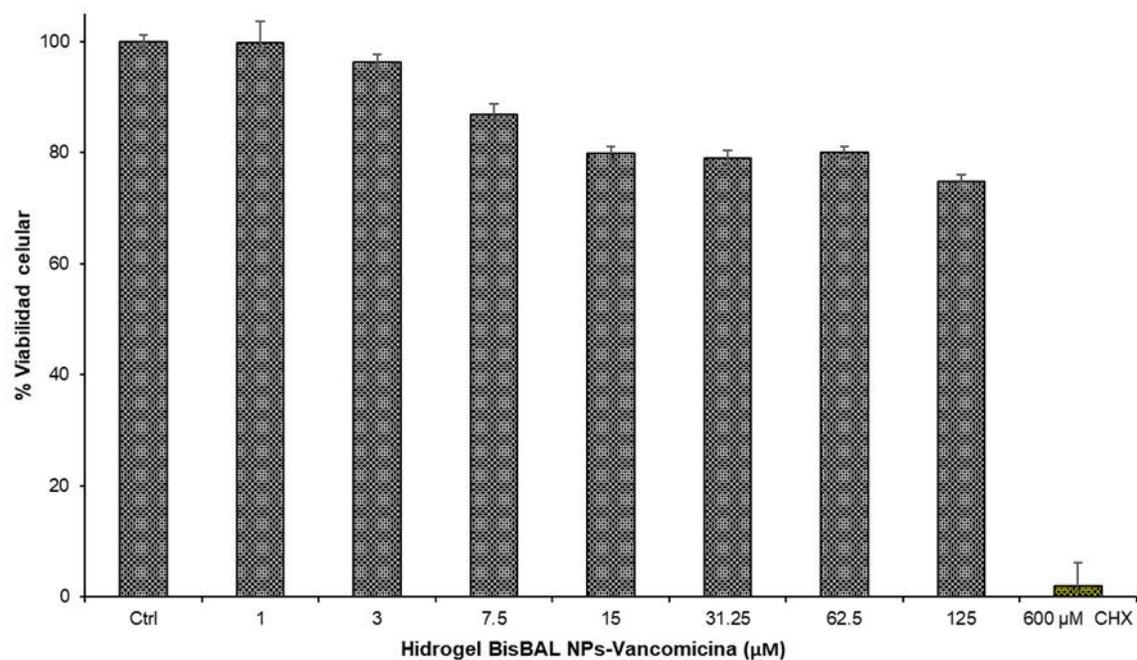


Figura 7. Citotoxicidad del hidrogel BisBAL NPs-Van sobre fibroblastos gingivales humanos. La viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos fue analizada mediante el uso del ensayo de viabilidad celular MTT post-exposición a diferentes concentraciones (1-125 µM) del hidrogel BisBAL NPs-Van. 0.12% (600 µM) de clorhexidina fue empleada como control positivo de citotoxicidad. El hidrogel BisBAL NPs-Van no mostró citotoxicidad comparación con el grupo control ($p < 0.0001$). Las barras de error indican la media \pm DS. Asterisco (*) indica diferencias estadísticas $\alpha = 0.05$.

9. DISCUSIÓN

La limpieza y desinfección del sistema de conductos radiculares durante el tratamiento de endodoncia continúa siendo un gran desafío³⁷. No siempre se logra el objetivo de remover todo el biofilm bacteriano intraconducto, debido a la compleja anatomía y porciones no instrumentadas de conductos radiculares. La estrategia más comúnmente seguida se basa en el uso de soluciones irrigantes, siendo el hipoclorito de sodio la principal opción de tratamiento a nivel mundial. Sin embargo, el tiempo de exposición al hipoclorito es demasiado corto (30-60 segundos), limitando su tiempo de acción. Interesantemente, Wu y cols., 2014 describieron que un hidrogel cargado con 2% de AgNP era más eficiente para remover el biofilm de *E. faecalis* sobre discos de dentina, en lugar de la misma solución de 2% de AgNP empleada como irrigante⁴³.

Como se menciona en el párrafo anterior, uno de los puntos principales del fracaso endodóntico es en cuanto a lograr una desinfección adecuada dentro del conducto radicular. Para lo cual, la medicación intraconducto tiene un papel importante, ya que busca eliminar el remanente bacteriano que pueda existir dentro del conducto después de la instrumentación e irrigación con NaClO. Existe cierta dificultad en lograr eliminar *E. faecalis* (casos de retx), ha sido ampliamente reportado en la literatura que *E. faecalis* es una de las especies más aisladas de los conductos radiculares fallidos/infectados con alta prevalencia como lo menciona Voit M, et al. (Voit M, et al. 2022).

La vancomicina tuvo el efecto esperado en este estudio, siendo un excelente antibiótico de última generación utilizado contra bacterias persistentes, ya que, en nuestra investigación al ser probado solo, mostró un halo de inhibición de 1-2 mm de diámetro. Se eligió este antibiótico por ser específico contra gram positivos e indicado contra bacterias multirresistentes (Rajendiran S, et al. 2022). Interesantemente, no se han aislado cepas resistentes a vancomicina de *E. faecalis* de pacientes con infección endodóntica, lo cual lo hace susceptible a vancomicina y se puede focalizar el tratamiento por ser gram positivo.

El potencial de las nanopartículas lipofílicas de bismuto se comprobó una vez más en este estudio, con una excelente actividad antimicrobiana a una concentración baja, mostrando un halo de inhibición por sí solo de 25mm. El autor Badireddy, et al. describe la manera en que funciona dicha actividad, y prueba una alta potencial en cuanto a sus concentraciones mínimas inhibitorias 5 y 10, sumando su gran biocompatibilidad por lo que se escoge utilizar estas nanopartículas, a diferencia de otras nanopartículas metálicas que reflejan alta toxicidad (Badireddy, A. R., et al. 2014) (Karuppaiah A, et al. 2023). Interesantemente en este estudio se demostró la eficacia antimicrobiana de BisBAL NP sobre *E. faecalis* aislado de paciente con infección endodóntica, sumando evidencia de su utilidad en la práctica clínica, y no solo contra cepas de laboratorio. Además el efecto antimicrobiano se demostró por dos métodos diferentes; ensayo de difusión en disco y ensayo de viabilidad celular MTT.

Al estudiar el efecto antibiofilm del hidrogel cargado con vancomicina y BisBAL NP, se encontró que la inhibición del biofilm fue total tanto en ensayos de live/dead y microscopia de fluorescencia, así como en el modelo de dentina y microscopia electrónica de barrido (SEM), mismo ensayo descrito por Wu y cols. (Wu y cols., 2014). Nuevamente este último ensayo empleando discos de dentina sugiere que el hidrogel BisBAL NP-Van podría ser empleado clínicamente por su efectividad antibiofilm sobre la anatomía dentinaria. Y tal como se mostró en los ensayos de citotoxicidad sobre fibroblastos humanos, el hidrogel BisBAL NP-Van no muestra efecto citotóxico, siendo un candidato natural para su empleo en la práctica clínica. Previamente se demostró la ausencia de citotoxicidad de las BisBAL NP sobre modelo murino, tanto en especies BALB/c, como en C57/BL/6 a dosis clínica de 50mg/Kg/día (García-Cuellar y Cols., 2022).

El uso de hidrogeles en la búsqueda de efectos sinérgicos es una nueva corriente en moda dentro de la medicina moderna. La presentación en hidrogel haciendo sinergia con dos agentes antimicrobianos y antibiofilm fue la manera en que se buscó utilizar para obtener este medicamento intraconducto, el hidrogel no pierde efectividad durante su almacenamiento conservando su pH neutro y no requiere de

refrigeración y tampoco requiere su remoción, ya que al ser biodegradable se evaporara con el tiempo liberando de manera prolongada los ingredientes activos (BisBAL NP y vancomicina). El hidrogel cargado con BisBAL NP-Van mostró alta actividad antimicrobiana y antibiofilm sobre *E. faecalis* aislado de pacientes, efecto similar al reportado por Wu y cols, empleando gel con AgNP (Wu y cols., 2014). De esta manera, el hidrogel biodegradable cargado con BisBAL NP y vancomicina puede llegar a ser una excelente alternativa para reemplazar al hidróxido de calcio y utilizarse como medicación intraconducto.

10. CONCLUSIÓN

Se presenta evidencia sólida acerca de la efectividad antimicrobiana y antibiofilm intraconducto (mediante dos técnicas diferentes) de un hidrogel biodegradable cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto y vancomicina sobre el *E. faecalis* aislado de paciente con infección endodóntica.

El hidrogel BisBAL NPs-Van fue estable sin modificarse su pH, efectividad antimicrobiana y no requiere de refrigeración/congelación.

El hidrogel BisBAL NPs-Van no mostro citotoxicidad sobre fibroblastos humanos, a diferencia de clorhexidina.

El hidrogel BisBAL NPs-Van al ser biodegradable, no requiere retirarse y es fácil de aplicar, por lo que constituye una alternativa innovadora y segura para ser utilizado como medicación intraconducto en el tratamiento de las infecciones endodónticas.

11. REFERENCIAS

1. Adeniji OO, Nontongana N, Okoh AI. Prevalence of Class 1 Integron and In Vitro Effect of Antibiotic Combinations of Multidrug-Resistant Enterococcus Species Recovered from the Aquatic Environment in the Eastern Cape Province, South Africa. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 3;24(3):2993.
2. Adigüzel M, Yilmaz K, Pamukçu İİ. Comparison of the efficacy of sonic irrigation and conventional syringe irrigation in the removal of curcumin and triple antibiotic paste from root canals. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2021 Summer;15(3):157-162.
3. Alam M, Sultan A, Chandra K. Microbiological Assessment of Chronic Otitis Media: Aerobic Culture Isolates and Their Antimicrobial Susceptibility Patterns. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2022 Dec;74(Suppl 3):3706-3712.
4. Alves-Silva EG, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, de-Jesus-Soares A, Ferraz CCR, Almeida JFA, Marciano MA, Steiner-Oliveira C, Bello-Silva MS, Shemesh H, Gomes BPFA. The effect of photodynamic therapy on postoperative pain in teeth with primary endodontic infection. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021 Dec 23;37:102700.
5. Badireddy, A. R., Hernandez-Delgadillo, R., Sánchez-Nájera, R. I., Chellam, S., & Cabral-Romero, C. (2014). Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(6).
6. Beegam KS, Joseph A, Singh VPP. Evaluation of the Antimicrobial Efficacy of *Elettaria cardamomum* Oil, *Trachyspermum ammi* Oil and 5% Sodium Hypochlorite Against *Enterococcus faecalis* Biofilm Formed on Tooth Substrate. *Contemp Clin Dent.* 2021 Oct-Dec;12(4):396-400.
7. Cabral-Romero C, Solís-Soto JM, Sánchez-Pérez Y, Pineda-Aguilar N, Meester I, Pérez-Carrillo E, Nakagoshi-Cepeda SE, Sánchez-Nájera RI,

- Nakagoshi-Cepeda MAA, Hernandez-Delgadillo R, Chellam S, García-Cuéllar CM. Antitumor activity of a hydrogel loaded with lipophilic bismuth nanoparticles on cervical, prostate, and colon human cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2020 Mar;31(3):251-259.
8. Cohen S, & Hargreaves KM. *Vías de la pulpa*. 10^a ed. Madrid: Elsevier Mosby; 2011.
 9. de Paz, L. C. E., Sedgley, C. M., & Kishen, A. (2015). *The Root Canal Biofilm*: 9 (2015 ed.). Springer.
 10. Dioguardi M, Spirito F, Sovereto D, Ballini A, Alovise M, Lo Muzio L. Application of the Extracts of *Uncaria tomentosa* in Endodontics and Oral Medicine: Scoping Review. *J Clin Med*. 2022 Aug 26;11(17):5024.
 11. Górecki I, Kołodziejczyk A, Harasymczuk M, Młynarczyk G, Szymanek-Majchrzak K. The Impact of Harsh Stratospheric Conditions on Survival and Antibiotic Resistance Profile of Non-Spore Forming Multidrug Resistant Human Pathogenic Bacteria Causing Hospital-Associated Infections. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Feb 4;20(4):2787.
 12. He X, Jin S, Fan W, Fan B. Synergistic In Vitro Antimicrobial Activity of Triton X-100 and Metformin against *Enterococcus faecalis* in Normal and High-Glucose Conditions. *Microorganisms*. 2022 Jan 7;10(1):124.
 13. Hernandez-Delgadillo R, Del Angel-Mosqueda C, Solís-Soto JM, Munguia-Moreno S, Pineda-Aguilar N, Sánchez-Nájera RI, Chellam S, Cabral-Romero C. Antimicrobial and antibiofilm activities of MTA supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles. *Dent Mater J*. 2017 Jul 26;36(4):503-510.
 14. Hernandez-Delgadillo R, García-Cuéllar CM, Sánchez-Pérez Y, Pineda-Aguilar N, Martínez-Martínez MA, Rangel-Padilla EE, Nakagoshi-Cepeda SE, Solís-Soto JM, Sánchez-Nájera RI, Nakagoshi-Cepeda MAA, Chellam S, Cabral-Romero C. In vitro evaluation of the antitumor effect of bismuth lipophilic nanoparticles (BisBAL NPs) on breast cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2018 Oct 5;13:6089-6097.

15. Jamshidi D, Ansari M, Gheibi N. Cytotoxicity and Genotoxicity of Calcium Hydroxide and Two Antibiotic Pastes on Human Stem Cells of The Apical Papilla. *Eur Endod J.* 2021 Dec;6(3):303-308.
16. Jass, J., Surman, S., & Walker, J. (2003). *Medical Biofilms.* Wiley.
17. Jiang F, Cai C, Gao L, Su X, Han S. Peptidoglycan-Directed Chemical Ligation for Selective Inhibition on Gram-Positive Bacteria. *ACS Omega.* 2022 Dec 30;8(2):2485-2490.
18. Karuppaiah A, Selvaraj D, Sellappan M, Nagarajan A, Babu D, Rahman H, Madheswaran T, Bose B, Natrajan T. A Perspective on Therapeutic Applications and Strategies to Mitigate Toxicity of Metallic Nanoparticles. *Curr Pharm Des.* 2023 Jan 9.
19. Kina, J. R., Kina, J., Kina, E. F. U., Kina, M., & Soubhia, A. M. P. (2008). Presence of bacteria in dentinal tubules. *Journal of Applied Oral Science,* 16(3), 205–208.
20. Madhukumar M, Geetha P, Nair KR, Unnikrishnan M. The Effects of Double Antibiotic Paste and Amoxicillin-clavulanate Paste Used in Endodontic Regeneration on Microhardness of Radicular Dentine: An In vitro Study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2021 Jun;13(Suppl 1):S510-S515.
21. Martínez-Martínez MA, Hernandez-Delgadillo R, Abada BS, Pineda-Aguilar N, Solís-Soto JM, Nakagoshi-Cepeda MAA, Nakagoshi-Cepeda SE, Chellam S, Sánchez-Nájera RI, Cabral-Romero C. Antimicrobial potential of bismuth lipophilic nanoparticles embedded into chitosan-based membrane. *Dent Mater J.* 2019 Jul 31;38(4):611-620.
22. Meire MA, van der Waal SV. A critical analysis of research methods and experimental models to study intracanal medicaments. *Int Endod J.* 2022 Jan 31.
23. Mohammadi, Z., & Dummer, P. M. H. (2011). Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal,* 44(8), 697–730.
24. Momenjavid M, Salimizand H, Korani A, Dianat O, Nouri B, Ramazanzadeh R, Ahmadi A, Rostampour J, Khosravi MR. Effect of calcium hydroxide on

- morphology and physicochemical properties of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Sci Rep*. 2022 May 9;12(1):7595.
25. Nunes BS, Rosendo RA, Filho AAO, Fook MVL, de Sousa WJB, Barbosa RC, Pina HV, da Silva Neto JE, Amoah SKS, Fontana CE, Bueno CEDS, De Martin AS. Chitosan-Based Biomaterial, Calcium Hydroxide and Chlorhexidine for Potential Use as Intracanal Medication. *Materials (Basel)*. 2021 Jan 20;14(3):488.
 26. Özel Y, Yılmaz U, Ünlü M, Vardar Ünlü G. Çeşitli Uçucu Yağ Bileşenleri ile Antibiyotiklerin Antibakteriyel Etkinliği ve Sinerjik Etkileşimi [Antibacterial Activity and Synergistic Interaction of Various Essential Oil Components and Antibiotics]. *Mikrobiyol Bul*. 2022 Jan;56(1):95-102. Turkish.
 27. Pedrinha VF, Alencar CM, Jassé FA, Zaniboni JF, Dantas AA, de Andrade FB, Kuga MC. Effect of the several epoxy resin-based sealer compositions on adhesion interface in radicular dentin after calcium hydroxide intracanal medication removal. *J Clin Exp Dent*. 2021 Sep 1;13(9):e913-e919.
 28. Phillips M, Rose J, Hamel A, Ingemi A. Safety and Feasibility Assessment of a Pharmacy-Driven AUC/MIC Vancomycin Dosing Protocol in a Multicenter Hospital System. *Microbiol Spectr*. 2023 Feb 22:e0331322.
 29. Rajendiran S, Veloo Y, Thahir SSA, Shaharudin R. Resistance towards Critically Important Antimicrobials among *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* in Poultry Farm Environments in Selangor, Malaysia. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Aug 18;11(8):1118.
 30. Rene HD, Badireddy AR, José MS, Francisco CC, Israel MG, Isela SN, Chellam S, Claudio CR. Cytotoxic Effect of Lipophilic Bismuth Dimercaptopropanol Nanoparticles on Epithelial Cells. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016 Jan;16(1):203-9.
 31. Ribeiro JS, Münchow EA, Bordini EAF, Rodrigues NS, Dubey N, Sasaki H, Fenno JC, Schwendeman S, Bottino MC. Engineering of Injectable Antibiotic-laden Fibrous Microparticles Gelatin Methacryloyl Hydrogel for Endodontic Infection Ablation. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 16;23(2):971.

32. Savur IG, Ulusoy OI. The effectiveness of ethylenediaminetetraacetic, etidronic, and peracetic acids activated with ultrasonics or diode laser on calcium hydroxide removal from root canal walls. *Niger J Clin Pract.* 2021 Nov;24(11):1662-1668.
33. Shi L, Wu S, Yang Y, Wan J. Efficacy of five irrigation techniques in removing calcium hydroxide from simulated S-shaped root canals. *J Dent Sci.* 2022 Jan;17(1):128-134.
34. Shreya, Jain G, Srinkhala, Singh P, Agarwal K. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Calcium Hydroxide, Triple Antibiotic Paste, and 2% Chlorhexidine Combined with 0.5% Cetrimide against *Enterococcus faecalis* Biofilm-Infected Dentin Model: An In vitro Study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2021 Nov;13(Suppl 2):S1538-S1543.
35. Siqueira, J. F., & Lopes, H. P. (1999). Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal*, 32(5), 361–369.
36. STUART, C., SCHWARTZ, S., BEESON, T., & OWATZ, C. (2006). *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93–98.
37. Sun X, Yang Z, Nie Y, Hou B. Microbial Communities in the Extraradicular and Intraradicular Infections Associated With Persistent Apical Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jan 12;11:798367.
38. Sy K, Agossa K, Maton M, Chijcheapaza-Flores H, Martel B, Siepmann F, Deveaux E, Blanchemain N, Neut C. How Adding Chlorhexidine or Metallic Nanoparticles Affects the Antimicrobial Performance of Calcium Hydroxide Paste as an Intracanal Medication: An In Vitro Study. *Antibiotics (Basel).* 2021 Nov 5;10(11):1352.
39. Torjani A, Selbst D, Hamsher J, Mujumdar S, Belkoff A, Taboada L. Successful Treatment With Daptomycin of MRSA Empyema Complicated by Right-Sided Loculated Pleural Effusion Refractory to Vancomycin. *Clin Med Insights Case Rep.* 2022 Feb 15;15:11795476221078532.

40. Torres-Betancourt JA, Hernandez-Delgadillo R, Flores-Treviño JJ, Solís-Soto JM, Pineda-Aguilar N, Nakagoshi-Cepeda MAA, Isela Sánchez-Nájera R, Chellam S, Cabral-Romero C. Antimicrobial potential of AH Plus supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles on *E. faecalis* isolated from clinical isolates. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2022 Jan-Dec;20:22808000211069221.
41. Voit M, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. In Vitro Evaluation of Five Newly Isolated Bacteriophages against *E. faecalis* Biofilm for Their Potential Use against Post-Treatment Apical Periodontitis. *Pharmaceutics*. 2022 Aug 25;14(9):1779.
42. Wong J, Manoil D, Näsman P, Belibasakis GN, Neelakantan P. Microbiological Aspects of Root Canal Infections and Disinfection Strategies: An Update Review on the Current Knowledge and Challenges. *Front Oral Health*. 2021 Jun 25;2:672887.
43. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):285-90.
44. Yaghmoor RB, Platt JA, Spolnik KJ, Chu TMG, Yassen GH. Effect of hydrogel-based antibiotic intracanal medicaments on crown discoloration. *Restor Dent Endod*. 2021 Oct 5;46(4):e52.
45. Zhang L, Zhu C, Liu X, Su E, Cao F, Zhao L. Study on Synergistic Antioxidant Effect of Typical Functional Components of Hydroethanolic Leaf Extract from *Ginkgo Biloba* In Vitro. *Molecules*. 2022 Jan 10;27(2):439.