



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y BIOCOMPATIBILIDAD DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COMO DESINFECCIÓN EN NEOTERAPIAS ENDODÓNTICAS

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención
Microbiología

**CHRISTIAN ANDRÉS JEREZ OLATE
CONCEPCIÓN- CHILE
2023**

Profesor Guía: Gabriela Sánchez Sanhueza
Departamento. de Odontología Restauradora
Facultad de Odontología
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. Gabriela Sánchez Sanhueza
Facultad de Odontología
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Helia Bello Toledo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Celia Fernandes de Lima
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Claudia Brizuela Cordero
Facultad de Odontología
Universidad de los Andes

Director de Programa

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

"A mi amada esposa, que ha sido mi roca y mi inspiración a lo largo de este viaje, gracias por estar a mi lado y apoyarme en cada paso del camino. Eres mi mayor motivación y mi razón para siempre esforzarme por alcanzar mis metas.

A mis padres, por ser la fuente de mi educación y mi ejemplo a seguir. Gracias por enseñarme la importancia del trabajo duro y la perseverancia, y por apoyarme incondicionalmente en cada decisión que he tomado.

Esta tesis es el resultado de su amor y su dedicación, y quiero dedicársela a ustedes con todo mi corazón. Espero que este logro les llene de orgullo y les demuestre cuánto les agradezco por todo lo que han hecho por mí. Les amo."

AGRADECIMIENTOS

Hoy, al presentar esta tesis, quiero agradecer a las personas que han sido un apoyo fundamental en este proceso de formación.

En primer lugar, quiero agradecer a mi esposa, María José Burgos, quien ha sido mi compañera de vida y mi mayor apoyo durante todo este camino. Gracias a ella, he encontrado la fuerza y la motivación para seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles. Su amor incondicional, su paciencia y su sabiduría han sido fundamental en mi vida, y sin ella, este logro no habría sido posible.

En segundo lugar, quiero agradecer a mis padres, Berta Olate y Christian Jerez T., quienes han sido esencial en mi educación y mi formación como persona. Gracias a su amor, su sacrificio y su dedicación, he tenido la oportunidad de llegar hasta aquí. Su ejemplo de trabajo duro, perseverancia, humildad y amor incondicional han sido mi mayor inspiración en todo momento.

En tercer lugar, quiero agradecer especialmente a la Dra. Gabriela Sánchez, al Dr. Andrés Opazo, al Dr. Gerardo González, a la Dra. Helia Bello, Paulina González y a toda la familia del LIAA por su invaluable apoyo y guía en este proyecto. Gracias a ellos, he aprendido más allá de lo que pensé posible, y su sabiduría y experiencia han sido fundamentales en el éxito de este trabajo. Su dedicación, paciencia y compromiso fueron vitales en mi vida y formación académica.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de alguna manera contribuyeron en este proyecto, ya sea con su tiempo, recursos o conocimientos. Sin su colaboración, este trabajo no habría sido tan enriquecedor.

Gracias a todos por su amor, apoyo y dedicación. Este logro no es solo mío, sino también de ustedes. Les agradezco desde lo más profundo de mi corazón.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Microbiota Oral.....	2
2.2. Microbiota de biopelículas endodónticas.....	4
2.3. Protocolos de desinfección.....	8
2.4. Resistencia a antimicrobianos y nanopartículas.....	11
2.5. Nanopartículas.....	12
2.6. Métodos de obtención y funcionalización de NPs.....	13
2.7. Actividad antibacteriana de NPs.....	15
2.8. Citotoxicidad y biocompatibilidad de NPs.....	17
2.9. Células del ligamento periodontal (<i>human periodontal ligament cells</i> (hPDLC)).....	20
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
4.1. Hipótesis.....	23
4.2. Objetivos.....	23
4.3. Objetivo general.....	23
4.4. Objetivos específicos.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24

5.1.	Materiales	24
5.1.1.	Nanogeles de cobre y de plata	24
5.1.2.	Cepas bacterianas.....	25
5.1.3.	Dientes	26
5.1.4.	Células humanas del ligamento periodontal	27
5.2.	Metodología.....	28
5.2.1.	Test modificado de contacto directo	28
5.2.2.	Análisis de la biopelícula bacteriana multiespecies mediante microscopía confocal de barrido láser (confocal laser scanning microscopy (CLSM)).	29
5.2.2.1.	Formación de biopelícula bacteriana ex vivo.....	29
5.2.2.2.	Microscopia CLSM.....	30
5.2.3.	Evaluación de Biocompatibilidad	32
5.3.	Análisis estadísticos	32
6.	RESULTADOS.....	35
6.1.	Test modificado de contacto directo modificado.....	35
6.1.1.	Ensayo de cinética de muerte.....	35
6.2.	Análisis de la biopelícula bacteriana multiespecies mediante CLSM. 41	
6.3.	Evaluación de biocompatibilidad	50
7.	DISCUSIÓN	56
8.	CONCLUSIONES	67
9.	PROYECCIONES	69
10.	GLOSARIO.....	70
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	72
12.	ANEXOS.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las características de los nanogeles de cobre y plata, utilizados en este estudio. Fuente: elaboración propia.	25
Tabla 2. Tabla resumen de los promedios y desviación estándar de la actividad antibacteriana de nanomateriales a distintos tiempos. Fuente: elaboración propia.	39
Tabla 3. Tabla resumen de los promedios y desviación estándar del porcentaje de células muertas en el tiempo. Fuente: elaboración propia.	43
Tabla 4. Comparación de volumen de biomasa de células vivas y muertas (μm^3) entre nanomateriales y controles a 1 hora y 7 días de acción. Fuente: elaboración propia.	49
Tabla 5. Análisis estadístico de promedio de porcentaje de células muertas (Sytox Green), proliferación y porcentaje de confluencia de los resultados de las imágenes obtenidas de IncuCyte. Fuente: elaboración propia.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Gráfico de cinética de muerte de distintos nanomateriales frente a <i>E. faecalis</i> . Ag1S (nanogel de plata de 1 paso con concentración alta de PVP/PVA), Cu1S (nanogel de cobre de 1 paso con concentración alta de PVP/PVA), Ag2S (nanogel de plata de dos pasos con concentración media de PVP/PVA), Cu2S (nanogel de cobre de dos pasos con concentración media de PVP/PVA). Fuente: elaboración propia.	36
Figura. 2 Grafico comparativo de actividad antibacteria de nanomateriales con distintas concentraciones de PVP/PVA a distintos tiempos de actividad ANOVA de dos vías, prueba de tukey $p < 0.05$. ns (sin diferencia significativa), *($p=0,0282$), *** ($p=0,0002$), ****($p <0,0001$). Ag1S: nanogel de plata de 1 paso, Cu1S: nanogel de cobre de 1 paso, Ag2S: nanogel de plata de 2 pasos, Cu2S: nanogel de cobre de 2 pasos. Fuente: elaboración propia.	37
Figura. 3 Gráfico comparativo de actividad antibacteriana de nanogeles de cobre. Cu1S (nanogel de cobre de 1 paso con concentración alta de PVP/PVA), Cu2S (nanogel de cobre de dos pasos con concentración media de PVP/PVA), [Alta] PVP/PVA (estabilizador concentración alta), [Media] PVP/PVA (estabilizador concentración media). Fuente: elaboración propia.	40
Figura. 4 Gráfico de porcentaje del volumen de biomasa de células muertas de biopelícula multiespecie madura frente a nanogeles Cu2S y Ag2S a 1 h, 24 h y 168 h de acción. Ag1S: nanogel de plata de 1 paso, Cu1S: nanogel de cobre de 1 paso, Ag2S: nanogel de plata de 2 pasos, Cu2S: nanogel de cobre de 2 pasos. Fuente: elaboración propia.	42
Figura. 5 Reconstrucción de imágenes 2D obtenidas en microscopía confocal de biopelículas tratadas con nanogeles de plata y cobre a 1 h, 24 h y 168 h. Ag2S A) a 1 h, C) 24 h, E) 168 h de acción. Cu2S B) a 1 h, D) 24 h, y F) 168 h de acción. Fuente: elaboración propia.	45
Figura. 6 Gráfico comparativo de volúmenes de biomasa de células vivas y muertas de biopelículas multiespecie madura en contacto con nanogeles Cu2S y Ag2S a 1 h y 168 h. Prueba Kruskal Wallis ($p < 0.05$). Prueba post hoc de Dunn's a 1 hora, ns (sin diferencias significativas), *(Cu2S vs Ag2S, $p=0,0275$) (Cu2S vs Control, $p=0,0143$), *** (Ag2S vs NaOCl, $p=0,0006$), a 168 h, ns (sin diferencias significativas), *(Cu2S vs Control, $p=0,0222$) (Cu2S vs Ca(OH) ₂ , $p=0,0372$) (Ag2S vs Control, $p=0,0455$) (Ag2S vs Ca(OH) ₂ , $p=0,0179$), ** ($p=0,0032$), *** ($p=0,0009$). Fuente: elaboración propia.	48

Figura. 7 Gráfico comparativo de porcentaje de células muertas, Proliferación celular y porcentaje de confluencia de células humanas del ligamento periodontal en contacto con nanogeles de 0 h a 72 h. Fuente: elaboración propia..... 51

Figura. 8 Imágenes obtenidas de plataforma de tiempo real IncuCyte de células humanas del ligamento periodontal en contacto con los distintos nanogeles y control a 0 h a 72 h. Ag1S A) 0 h, F) 24 h, K) 48 h, P) 72 h de aplicación. Ag2S B) 0 h, G) 24 h, L) 48 h, Q) 72 h de aplicación. Cu1S C) 0 h, H) 24 h, M) 48 h, R) 72 h de aplicación. Cu2S D) 0 h, I) 24 h, N) 48 h, S) 72 h. Control sin material D) 0 h, J) 24 h, O) 48 h y T) 72 h de aplicación. Fuente: elaboración propia..... 55

Figura 9. Gráfico comparativo de actividad antibacteriana de nanomateriales de plata Ag1S (nanomaterial de plata con concentración alta de PVP/PVA), Ag2S (nanomaterial de plata con concentración media de PVP/PVA), [Alta] PVP/PVA (estabilizador concentración alta), [Media] PVP/PVA (estabilizador concentración media). Ag1S: nanogel de plata de 1 paso, Ag2S: nanogel de plata de 2 pasos. Fuente: elaboración propia. 83

Figura 10. Gráfico de porcentaje del volumen de biomasa de células muertas y vivas de biopelícula multiespecie a 21 días de maduración sin material (Control Bacteria). Porcentaje de volumen de biomasa de células muertas (barra de color rojo), Porcentaje de volumen de biomasa de células vivas (barra de color verde). Fuente: elaboración propia. 84

Figura. 11 Gráfico comparativo de porcentaje de células muertas, proliferación celular y porcentaje de confluencia de hPDLC en contacto con los agentes funcionalizadores de concentración media y alta de 0 h a 72 h. [Alta] PVP/PVA (estabilizador concentración alta), [Media] PVP/PVA (estabilizador concentración media), hPDLC (células humanas del ligamento periodontal. Fuente: elaboración propia..... 85

RESUMEN

Introducción: En endodoncia, existen múltiples infecciones de origen bacteriano, que provocan una enfermedad común conocida como periodontitis apical. Por consiguiente, el objetivo principal de los tratamientos en endodoncia es tratar o prevenir el desarrollo de lesiones perirradiculares asociadas a esta enfermedad, mediante la erradicación del componente bacteriano durante la preparación quimio-mecánica. Sin embargo, la tasa de éxito de dientes con estas lesiones alcanza un 85%, disminuyendo a un 68% en los retratamientos. En consecuencia, existe una búsqueda constante de nuevos materiales que puedan contribuir a mejorar la tasa de éxito de la terapia endodóntica. Desde esta perspectiva, basándonos en las beneficiosas propiedades y características antibacterianas y de biocompatibilidad de las nanopartículas metálicas, estas pueden ser una alternativa o coadyuvante a los protocolos actuales como nuevas terapias de desinfección.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana y la biocompatibilidad de nanogeles nanoestructurados de cobre y plata combinados con una matriz polimérica de PVA/PVP.

Metodología: En primer lugar, se realizó un screening de la actividad antibacteriana de los nanogeles mediante la determinación de la cinética de muerte por el test de contacto directo frente a *Enterococcus faecalis*, seleccionando los nanogeles con mayor actividad antibacteriana. En segundo lugar, utilizando un modelo de diente *ex vivo* con una biopelícula bacteriana multiespecie madura de 21 días, se cuantificó la viabilidad bacteriana postratamiento de los nanogeles por medio de microscopia confocal; además, mediante, el uso de células humanas del ligamento periodontal y de la plataforma de célula viva en tiempo real IncuCyte S3 fue posible evaluar la biocompatibilidad de los nanogeles.

Resultados y Conclusión: Este es el primer reporte en el cual se evalúan nanopartículas de cobre y plata estabilizadas con matrices poliméricas de PVA/PVP (nanogeles) en biopelículas bacterianas endodónticas multiespecies y la citotoxicidad empleando la plataforma de célula viva en tiempo real IncuCyte S3. Dentro de los resultados obtenidos en este estudio con relación a la actividad antibacteriana y la citotoxicidad de los nanogeles testeados, evidenciaron que el tiempo de utilización óptimo de estos nanomateriales frente a una biopelícula bacteriana endodóntica multiespecie, es a las 168 h. Asimismo, a medida aumentan los tiempos de acción frente a las células humanas del ligamento periodontal disminuye la citotoxicidad de los nanogeles, proporcionando un material alternativo al hidróxido de calcio durante la medicación en los tratamientos de conductos.

ABSTRACT

Introduction: In endodontics, multiple bacterial infections cause a common disease known as apical periodontitis. Therefore, the main objective of endodontic treatments is to treat or prevent the development of periradicular lesions associated with this disease, by eradicating the bacterial component during chemomechanical preparation. However, the success rate of teeth with these lesions reaches 85%, decreasing to 68% in retreatments. Consequently, there is a constant search for new materials that can contribute to improving the success rate of endodontic therapy. From this perspective, based on the beneficial properties and antibacterial characteristics and biocompatibility of metallic nanoparticles, they can be an alternative or coadjuvant to current protocols as a new disinfection therapies..

Aim: The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity and biocompatibility of copper and silver nanostructured nanogels combined with a PVA/PVP polymeric matrix.

Methodology: First, a screening of the antibacterial activity of nanogels was carried out by determining the death kinetics by the direct contact test against *Enterococcus faecalis*, selecting the nanogels with the highest antibacterial activity. Second, using an ex vivo tooth model with a mature 21-day multispecies

bacterial biofilm, bacterial viability after nanogel treatment was quantified using confocal microscopy; additionally, the biocompatibility of the nanogels was evaluated using human periodontal ligament cells and the real-time IncuCyte S3 platform.

Results and Conclusion: This is the first report in which copper and silver nanoparticles stabilized with PVA/PVP polymeric matrices (nanogels) are evaluated in multispecies endodontic bacterial biofilms and cytotoxicity using the real-time IncuCyte platform. Among the results obtained in this study regarding the antibacterial activity and cytotoxicity of the tested nanogels, they showed that the optimal utilization time of these nanomaterials against a multispecies endodontic bacterial biofilm is 168 h. Likewise, as the action times against human periodontal ligament cells increase, the cytotoxicity of nanogels decreases, providing an alternative material to calcium hydroxide during canal treatment medication.

1. INTRODUCCIÓN

En endodoncia, existen múltiples infecciones de origen bacteriano, que provocan una enfermedad común conocida como periodontitis apical, condición inflamatoria causada por invasión microbiana de la pulpa dental y del sistema de conductos radiculares, pudiendo generar lesiones perirradiculares y cuadros clínicos agudos o crónicos. Por consiguiente, el objetivo principal de los tratamientos en endodoncia es tratar o prevenir el desarrollo de lesiones perirradiculares asociadas a esta enfermedad, mediante la erradicación del componente bacteriano durante la preparación quimio-mecánica. Sin embargo, las bacterias que ingresan al sistema de conductos radiculares se establecen como biopelículas, las cuales están asociadas a las distintas infecciones endodónticas y lesiones perirradiculares, además, son altamente resistentes a los tratamientos convencionales, en donde la tasa de éxito de dientes con estas lesiones asociadas a biopelículas alcanza un 85%, disminuyendo a un 68% en los retratamientos. En consecuencia, existe una búsqueda constante de nuevos materiales que puedan contribuir a los protocolos de desinfección utilizados actualmente y mejorar la tasa de éxito de la terapia endodóntica. Desde esta perspectiva, basándonos en las beneficiosas propiedades y características antibacterianas y de biocompatibilidad de las nanopartículas metálicas, estas

pueden ser una alternativa o coadyuvante a los protocolos utilizados como desinfección.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Microbiota Oral

En el humano, la microbiota oral es la segunda más compleja después de la microbiota del intestinal, debido a que está inserta en la cavidad oral, la cual presenta una superficie de 215 cm² con abundantes y variados nichos ecológicos (mejillas, lengua, encía insertada, dientes, surco gingival, paladar duro, paladar blando), con distintos niveles de oxígeno y nutrientes, lo que proporciona condiciones que permiten el desarrollo de un amplio espectro de microorganismos, los que interactúan en equilibrio con las diferencias genéticas/fenotípicas, la dieta, el sistema inmune entre otros factores del hospedero, lo cual se denominada simbiosis (Curtis et al., 2020; Hu et al., 2019; Kilian et al., 2016). Dentro de esta microbiota, se han logrado aislar e identificar más de 700 taxones bacterianos, de los cuales el 32% se conocen sólo como filotipos no cultivables en los medios de cultivo disponibles (Kilian et al., 2016; Wade, 2013). En la cavidad oral podemos encontrar *phyla* como Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias, Actinobacterias, Spirochaetes y Fusobacterias que en conjunto representan el 96% de las especies detectadas (Wade, 2013).

Las comunidades bacterianas se adhieren a la superficie de estos microambientes como biopelículas (Crull et al., 2011). Las biopelículas orales en disbiosis (condición en la que se altera la estructura normal de la población de microorganismos) están estrechamente relacionadas con las enfermedades que afectan la salud de la cavidad oral, tales como caries, gingivitis, enfermedad periodontal, mucositis, periimplantitis y periodontitis apical. Estas biopelículas son altamente resistentes a agentes antibacterianos tradicionales (Hu et al., 2019) debido a diversos factores, tales como el retraso en la penetración de estos agentes a través de la matriz extracelular de la biopelícula, a la alteración en la tasa de crecimiento de los microorganismos que la componen y a otros cambios fisiológicos producto del crecimiento de la biopelícula, como por ejemplo la limitación de nutrientes y el aumento de metabolitos tóxicos que alteran la velocidad de crecimiento (Donlan & Costerton, 2002). Por otro lado, es importante señalar que estas biopelículas polimicrobianas, formadas principalmente por bacterias, presentan alta carga genética asociada a patogenicidad, virulencia y resistencia, debido al constante intercambio genético entre los microorganismos que las conforman (Donlan & Costerton, 2002), en donde, la expresión genética de los determinantes asociados a resistencia a antimicrobianos es la principal causa de fracasos en los tratamientos odontológicos (Moreno et al., 2017; Salas-Orozco et al., 2019). Es así como, Hu *et al.*, categorizaron y caracterizaron las biopelículas asociadas a enfermedades orales (Hu et al., 2019). Específicamente, las biopelículas supragingivales están presentes en la superficie del esmalte o

del cemento en el margen gingival y se asocian a caries dental y gingivitis, donde el género dominante es *Streptococcus* spp. (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*), caracterizado por mayor presencia de bacterias Gram positivas. Por otro lado, a nivel subgingival, encontramos biopelículas adheridas presentes en el cemento asociadas a caries radicular, compuestas principalmente por bacterias Gram positivas (cocáceas como *S. sanguinis*, *S. mitis* y bacilos como *Actinomyces* spp.), y biopelículas no adheridas presentes en el espacio entre el epitelio de unión y epitelio sulcular asociadas a periodontitis, formadas generalmente por bacterias Gram negativas anaeróbicas tales como *Spirochaetes* spp., *Selenomonas* spp., *Capnocytophaga* spp. Por otro lado, en la cámara pulpar y en el sistema de conductos radiculares se establecen biopelículas endodónticas que pueden estar asociadas a pulpitis, necrosis pulpar y periodontitis apical, donde hay mayor cantidad de bacterias anaerobias estrictas como *Porphyromonas* spp y *Prevotella* spp (Hu et al., 2019).

2.2. Microbiota de biopelículas endodónticas.

Diversas investigaciones se han realizado a lo largo del tiempo para identificar los microorganismos que componen la microbiota endodóntica, desde aislamiento en cultivos hasta secuenciación masiva, lo que ha permitido identificar alrededor de 500 especies microbianas, de las cuales 20 a 30 son las más prevalentes en los diferentes estadios de las patologías pulpares y perirradiculares (Gomes et al., 2004; Manoil et al., 2020; Pinheiro et al., 2003;

Rocas & Siqueira, 2012; Sakamoto et al., 2006; Siqueira et al., 2016; Siqueira & Rocas, 2005; Siqueira et al., 2000; Sunde et al., 2002).

Dentro de las infecciones que se pueden presentar en el sistema de conductos radiculares, se ha descrito la infección primaria, secundaria, persistente y extrarradicular, que estarían asociadas a una microbiota con distintas características, desde su composición y diversidad taxonómica hasta la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC). Estos microorganismos generan diversos cuadros clínicos, pero una enfermedad en común, conocida como periodontitis apical, que es una condición inflamatoria causada por invasión microbiana de la pulpa dental y del sistema de conductos radiculares, pudiendo generar lesiones perirradiculares (Manoil et al., 2020).

En este contexto, el objetivo primordial del tratamiento endodóntico es tratar o prevenir el desarrollo de lesiones perirradiculares (Siqueira et al., 2014). Sin embargo, las infecciones secundarias se caracterizan principalmente por ser causadas por microorganismos que no estaban presentes en la infección primaria, y penetraron al interior del conducto durante el tratamiento de endodoncia. Además, las infecciones persistentes presentan microorganismos que resistieron a los procedimientos de desinfección (pertenecientes a la infección primaria y/o secundaria) (Lopes & Siqueira, 2021), lo que se traduce en el fracaso del tratamiento, implicando una reintervención.

Ricucci y Siqueira, demostraron que en el 77% de los dientes presentaban biopelículas al interior del conducto radicular en un estudio de prevalencia clínica e histopatológica de dientes tratados y no tratados con lesiones perirradiculares. Además, este mismo estudio demostró que el 74% de los dientes tratados y con lesiones perirradiculares, es decir, con fracaso endodóntico, también presentaban biopelículas en la porción apical del sistema de conducto radicular (Ricucci & Siqueira, 2010).

Por otro lado, la tasa de éxito que se ha descrito para los procedimientos de retratamiento es variable, debido a las múltiples diferencias asociadas a los factores preoperatorios, como presencia o no de lesión apical previa, o la calidad del relleno previo, o a diferencias asociadas a los factores intraoperatorios como es el número de sesiones, entre otros. Es interesante resaltar los resultados de , Chevigny *et al.*, quienes demostraron que en dientes con lesión previa, una calidad de relleno adecuado, el índice de reparación apical fue menor que en dientes bien tratados, con un 50% y un 86%, respectivamente (de Chevigny et al., 2008) Los autores mencionan que esto se debe a que la microbiota intraconducto que produce la periodontitis apical posterior al tratamiento en dientes con un relleno radicular inadecuado puede parecerse a la de la infección primaria y ser susceptible al tratamiento ortógrado. Por el contrario, la microbiota de los conductos bien obturados puede ser más resistente al tratamiento ortógrado. Además, en dientes con obturaciones radiculares aparentemente adecuadas, la enfermedad puede ser sostenida ocasionalmente por biopelículas

extrarradiculares, quistes apicales, reacciones de cuerpo extraño o grietas radiculares no diagnosticadas. Todos ellos serían refractarios al tratamiento ortógrado (de Chevigny et al., 2008). Y.-L. Ng *et al.*, investigaron mediante una revisión sistemática, los índices de éxitos de retratamientos y los factores clínicos asociados a este, mostrando que la tasa de éxito alcanzaba un 77%, en donde, la presencia de lesiones perirradiculares preoperatorias, la obturación radicular próxima al ápice y la calidad de la restauración coronaria eran importantes factores determinantes del pronóstico exitoso de estos tratamientos, lo que concuerda con el estudio previamente mencionado (Ng et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, existen diversos estudios en donde la microbiota oral endodóntica de las distintas infecciones, se caracterizan mediante técnicas de cultivo y técnicas moleculares. En este sentido, en relación a las infecciones secundarias/persistentes, Anderson *et al.*, identificaron 277 géneros, siendo los más abundantes *Streptococcus* (10,9%), *Prevotella* (8,21%), *Lactobacillus* (8,06%), *Kocuria* (5,17%), *Neisseria* (3,38%) y *Enterococcus* (2,59%) (Anderson et al., 2013). Por otro lado, Siqueira *et al.*, identificaron una gran abundancia de los géneros *Fusobacterium* y *Pseudomonas* (15%), seguidas de *Enterococcus* (2%)(Siqueira et al., 2016). Zandi *et al.* informaron de una serie de géneros abundantes, tales como *Fusobacterium* (12,7%), *Streptococcus* (9,8%), *Actinomyces* (8,2%), *Desulfobulbus* (5,2%), *Fretibacterium* (3,6%), *Treponema* (2,3%) o *Prevotella* (2%) junto con *Enterococcus* (Zandi et al., 2018). Sánchez-Sanhueza *et al.*, a través de un estudio metagenómico de infecciones

endodónticas persistentes identificaron que el *phylum* más abundante fue Proteobacterias seguido de Bacteroidetes (Sanchez-Sanhueza et al., 2018). De esta forma, estos estudios nos ayudan comprender la diversidad y complejidad de las biopelículas endodónticas, generando nuevas técnicas y enfoques en desinfección. Está claro bajo esta perspectiva que los resultados tanto del tratamiento primario como del retratamiento del conducto radicular están influenciados predominantemente por la naturaleza de la interacción dinámica previa entre el hospedero y la infección (factores preoperatorios del paciente) y por la eficacia activa del protocolo de tratamiento del conducto radicular para producir un cambio ecológico microbiano (Gulabivala & Ng, 2023).

2.3. Protocolos de desinfección

En odontología se desarrollan constantemente nuevas técnicas para alterar y desestabilizar esta interacción estrecha que presentan las comunidades bacterianas presentes en las biopelículas, y además, restaurar, reparar y/o regenerar los daños en las estructuras de la cavidad oral (dientes, tejidos de soporte y protección) aplicando un enfoque mínimamente invasivo (Schwendicke et al., 2018).

El uso de soluciones irrigantes y pastas alcalinas antimicrobianas cumplen un rol esencial en el éxito de la debridación y desinfección del sistema de conductos (D'Arcangelo et al., 1999; Goncalves et al., 2016), sin embargo, las bacterias organizadas en biopelículas son entre 10 a 1000 veces más resistentes a agentes

antimicrobianos y antibióticos que bacterias planctónicas, y a su vez, son capaces de evadir el sistema inmune (Ciofu et al., 2017; Hall & Mah, 2017; Jan, 2017; Venkatesan et al., 2015). El hipoclorito de sodio (NaOCl) es la solución irrigante con propiedades antimicrobianas, considerada como el “*gold standard*” en la desinfección de tratamientos de sistema de conductos. Varios estudios demuestran una excelente actividad antimicrobiana de este compuesto (Harrison et al., 1990; Pladisai et al., 2016; Priyank et al., 2017; Siqueira et al., 1997), sin embargo, presenta una limitada acción para eliminar completamente las biopelículas del sistema de conductos radiculares provocando la persistencia de la infección (Ricucci & Siqueira, 2010). Ozdemir *et al.*, concluyeron que la aplicación combinada de EDTA al 17% y NaOCl al 2,5% reduce significativamente la cantidad de biopelícula intraconducto, además, la actividad de NaOCl frente a la biopelícula multiespecies o mono especie, es dependiente de la concentración (Ozdemir et al., 2010). Clegg *et al.*, demostraron que la concentración de NaOCl del 6%, fue capaz de generar bacterias inviables y eliminar físicamente la biopelícula multiespecie, en donde concentraciones inferiores a esta lograban alterar la biopelícula, sin embargo permanecieron bacterias en los dientes evaluados (Clegg et al., 2006). Por el contrario, Rosen *et al.*, publicaron que el NaOCl induce un estado viable pero no cultivable de las bacterias en las biopelículas y esto podría contribuir a la persistencia bacteriana (Rosen et al., 2016). Adicionalmente, el NaOCl interactúa con tejido orgánico e inorgánico, disolviéndolos mediante reacciones de saponificación, de

neutralización y de cloraminación, produciendo tanto degradación de ácidos grasos como la oxidación e hidrólisis de las proteínas celulares, en otros términos, provoca una reducción en el módulo elástico y la resistencia a la flexión de la dentina, incluso, la inyección accidental de NaOCl más allá del foramen apical, puede provocar daños al contactar con los tejidos periapicales, como necrosis, hemólisis, edema, entre otros síntomas (Mohammadi, 2008; Yin et al., 2020). Además, esta propiedad depende de diversos factores como frecuencia de agitación, la relación entre la cantidad de NaOCl /materia orgánica, la superficie de contacto entre el tejido e NaOCl, tiempo de acción, concentración y frecuencia de renovación de la solución (Lopes & Siqueira, 2021; Mohammadi, 2008). En otras palabras, durante el tratamiento de endodoncia, se debe realizar un recambio constante de la solución de NaOCl.

Por otro lado, el uso de pastas alcalinas como medicación intraconducto, presenta acción limitada frente a las biopelículas bacterianas, es más, se desconoce si pueden interrumpir o eliminar las biopelículas del sistema de conductos radiculares (Estrela et al., 2009). El hidróxido de calcio $[Ca(OH)_2]$ es la pasta medicamentosa usada comúnmente en endodoncia para el tratamiento de dientes con lesiones persistentes, sin embargo, se ha demostrado que es ineficaz para erradicar biopelículas de *Enterococcus faecalis* (Upadya et al., 2011). Esto puede deberse a diversos factores como la actividad amortiguadora de la dentina frente a medicamentos, a los restos de tejido pulpar necrótico, y también al exudado inflamatorio (Meire & van der Waal, 2022; Mohammadi &

Dummer, 2011). Además, el uso prolongado superior a 7 días puede provocar reducción en la resistencia a la flexión y a la fractura del diente (Mohammadi & Dummer, 2011). En relación con su toxicidad, este medicamento es bien tolerado por los tejidos óseos y la pulpa dental (Mohammadi & Dummer, 2011).

2.4. Resistencia a antimicrobianos y nanopartículas.

Recientemente, la tasa de microorganismos resistentes a antibióticos ha aumentado de forma considerable, en donde el campo de la microbiología oral no es ajeno a este fenómeno. Actualmente la farmacorresistencia es un problema de salud pública mundial debido a la presión selectiva que genera el uso de antibióticos (Executive, 2019). Estas nuevas cepas han colonizado un nicho ecológico previamente ocupado por cepas susceptibles, fenómeno que ocurre en infecciones crónicas, limitando o dejando sin alternativas de tratamientos antimicrobianos efectivos para estas enfermedades (Lewis, 2010). En este contexto, los nanomateriales (como las nanopartículas de óxidos metálicos) pueden convertirse en una alternativa viable para prevenir o tratar infecciones bucales, ya que han demostrado ser eficaces en infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos, debido a sus propiedades biocidas y antiadherentes frente a las biopelículas (Song & Ge, 2019), y así, se podría lograr disminuir la presión ejercida por el sobreuso y mal uso de antibióticos (Khan et al., 2016; Vallet-Regi et al., 2019). Se sugiere que la probabilidad de que una bacteria adquiera resistencia a las nanopartículas metálicas es menor que a los antimicrobianos convencionales, debido a que los metales pueden actuar sobre

diversas estructuras microbianas, por lo tanto, la resistencia a estos nanomateriales involucra un conjunto de cambios en la célula bacteriana (Allaker & Memarzadeh, 2014).

2.5. Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) pueden ser sintetizadas a partir de una variedad de materiales, como metales nobles (oro [Au], plata [Ag], platino [Pt], paladio [Pd]), semiconductores (sulfuro de zinc [ZnS], cobre [Cu], óxido de titanio [TiO₂], silicio [Si]) entre otros (Thanh & Green, 2010). Estas nanopartículas tienen una amplia gama de aplicaciones en varios campos dentales tales como endodoncia, implantología, odontología restauradora, prótesis dentales, ortodoncia y otros, en donde se ha analizado su actividad principalmente en modelos *in vitro* (Allaker & Memarzadeh, 2014; Shrestha & Kishen, 2016; Song & Ge, 2019). Sin embargo, estos se deben complementar con modelos *ex vivo* e *in vivo* para comprender mejor el efecto biológico de las nanoestructuras propuestas, en donde se deben considerar su citotoxicidad, como se metabolizan, su biodistribución y su mecanismo de acción, con el objetivo de poder ser aplicados correctamente para la práctica clínica (Vallet-Regi et al., 2019).

Las NPs metálicas tienen un diámetro que varía de 5 a 100 nm y se encuentran en varias formas (cilíndricas, circulares, varillas, etc.) (Shrestha & Kishen, 2016). Las NPs son potencialmente útiles en este contexto, debido a que tienen propiedades fisicoquímicas únicas e inusuales, como tamaños ultra pequeños,

gran relación superficie/masa, reactividad química y alta compatibilidad para la modificación de la superficie, además presentan dimensiones, propiedades y funciones similares a biomoléculas como péptidos pequeños, proteínas y ácidos nucleicos (Veerapandian & Yun, 2011). Estas propiedades son importantes desde la perspectiva del uso seguro de nanomateriales (Nel et al., 2009; Rudramurthy et al., 2016).

2.6. Métodos de obtención y funcionalización de NPs.

Uno de los métodos químicos y físicos más utilizados para la obtención de NPs es el método electroquímico, debido a su facilidad de operación, cinética de obtención y pequeños rangos de distribución de tamaño de las NPs, utilizando diferentes electrodos, agentes estabilizantes y variables de síntesis (Durán Almendárez, 2019; Shahcheraghi et al., 2018). Sin embargo, estas NPs presentan una alta toxicidad, en donde una alternativa a este problema es la funcionalización de estas. Los métodos más utilizados para funcionalizar NPs son la unión covalente, la unión no covalente, la inmovilización asistida por reacción de acoplamiento, el recubrimiento/deposición simple, la técnica de Stöber, y las técnicas de micela inversa y sol-gel, en donde el principio común de todas estas técnicas es la formación de un complejo entre dos sustancias complementarias (Veerapandian & Yun, 2011). Dentro de los agentes estabilizantes o métodos de funcionalización encontramos surfactantes estabilizadores con grupos funcionales fácilmente polimerizables denominados 'surfmers', los que permiten formar matrices poliméricas nanoestructuradas con propiedades funcionales

(Veerapandian & Yun, 2011). Un representante de estos agentes es el polivinil alcohol (PVA), ya que es un polímero sintético hidrofílico, con grupos hidroxilo polimerizables, no tóxico, soluble en agua, biodegradable, biocompatible, con buenas propiedades mecánicas, y estable durante largos períodos en diferentes condiciones de temperatura y pH. Además, este polímero se ha usado ampliamente para la estabilización de NPs de plata (AgNPs) (Cardoso, 2016). A partir de él se pueden obtener hidrogeles por entrecruzamiento físico o químico, aplicados en las áreas biomédicas, odontológicas y farmacéuticas (Carhuapoma, 2006; Echeverri et al., 2009). La gran ventaja de la generación de estos hidrogeles es la posibilidad de incorporar agentes antibacterianos, fármacos y moléculas que potencien el crecimiento celular (Kyrychenko et al., 2017; Rodriguez Nunez et al., 2019). La dosificación de fármacos en la cavidad oral es una importante alternativa de desinfección prolongada (Aksel et al., 2020). En el caso particular de la desinfección del conducto radicular, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que geles antibacterianos son más eficaces que soluciones de AgNPs frente a la interrupción de la integridad estructural de biopelículas bacterianas de *E. faecalis* (Wu et al., 2014). En este sentido, Samiei *et al.*, sintetizaron hidrogeles reticulados mediante copolimerización vía radicales libres de Poli (N-isopropilacrilamida-co-ácido metacrilico-vinipirrolidona) y evaluaron el efecto antibacteriano de un hidrogel nanoestructurado a una concentración de 30 ppm en conductos radiculares infectados con *E. faecalis* en comparación con NaOCl al 2.5% y gluconato de clorhexidina (CHX) al 2.0%.

Según sus resultados, el hidrogel mantuvo su actividad en la reducción de las bacterias de forma más eficiente en comparación con las soluciones de NaOCl y CHX (Samiei et al., 2014).

2.7. Actividad antibacteriana de NPs.

Interesantemente, se ha demostrado una relación inversa entre el tamaño de las NPs y la actividad antimicrobiana, en donde las partículas en el rango de tamaño de 1 a 10 nm tienen una mayor actividad antimicrobiana en comparación con las partículas más grandes. En bacterias Gram negativas, se ha informado que las NPs actúan principalmente en el rango de 1-10 nm (Rudramurthy et al., 2016). Estas partículas se adhieren a la superficie de la membrana celular y alteran drásticamente las funciones como la permeabilidad celular y la respiración. Además, pueden penetrar a las bacterias y causar más daño debido a una posible interacción con compuestos que contienen azufre y fósforo, como el ADN y proteínas, y también liberan iones, que además contribuyen al efecto bactericida de las NPs (Nel et al., 2009). Es importante considerar que las NPs más pequeñas son más tóxicas que las más grandes, y más aún cuando se oxidan (Lok et al., 2007). La forma de la nanoestructura también puede afectar la actividad de las NPs, como se ha demostrado contra cepas de *Escherichia coli*, en donde las nanoestructuras de plata de múltiples facetas activas mostraron la mayor actividad biocida en comparación con las NPs esféricas y en forma de varilla (Pal et al., 2007).

De las variadas NPs metálicas descritas, las propiedades antimicrobianas de las AgNPs han sido ampliamente estudiadas (Siddiqi et al., 2018). Por otro lado, el cobre (Cu) y sus óxidos también han demostrado ser potentes antimicrobianos (Ameh & Sayes, 2019). Estos muestran un perfil antimicrobiano más potente en comparación con el óxido de zinc (ZnO), pero menor que Ag (Vargas-Reus et al., 2012). No obstante, el Cu es más barato que la Ag, fácilmente miscible con polímeros y relativamente estable química y físicamente (Ren et al., 2009).

Dado que las NPs de cobre y plata (CuNPs y AgNPs, respectivamente) son muy diversas en tamaño, forma y química de superficie, la comprensión integral de cómo estos factores estructurales impactan en sus actividades antimicrobianas ayudará a ampliar aún más sus aplicaciones biomédicas. Ambos nanomateriales tienen un excelente efecto antibacteriano, en donde estas propiedades se ven alteradas por la concentración, el tipo, la forma, entre otros factores. (Song & Ge, 2019).

Por otro lado, el uso y exposición de estos nanomateriales ha aumentado en la actualidad, los cuales se han utilizado en la industria de alimentos y bebestibles hasta en productos farmacéuticos, debido a la interacción de las NPs con los tejidos corporales (piel, intestino, cavidad oral, entre otros) (Qiu et al., 2018). Desde el punto de vista microbiológico, es importante determinar cómo puede repercutir el resultado de estas interacciones, de manera positiva o negativa en

el hospedero, manteniendo la simbiosis o favoreciendo disbiosis en el ambiente donde se aplican (Qiu et al., 2018).

2.8. Citotoxicidad y biocompatibilidad de NPs.

La biocompatibilidad es un requisito esencial de cualquier material en endodoncia. Ésta se define como la capacidad de un material para no causar efectos nocivos en las células o tejidos con los que entra en contacto, es decir, un material biocompatible no debe provocar reacciones adversas tales como toxicidad, irritación, inflamación, alergia o carcinogenicidad (Al-Haddad & Che Ab Aziz, 2016). Por otro lado, la citotoxicidad es la capacidad de una sustancia para causar la muerte celular, ya sea a través de la apoptosis o la necrosis (Istifli et al., 2019).

La evaluación de la citotoxicidad de los nanomateriales utilizados en aplicaciones orales implica medir diversos parámetros celulares, incluyendo la viabilidad, la proliferación y la muerte celular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros (Istifli et al., 2019). Estos ensayos nos permiten garantizar la seguridad y eficacia de los nanomateriales utilizados en la cavidad oral.

Los ensayos de MTT (bromuro de 3- [4,5- dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio) o LDH (lactato deshidrogenasa) son técnicas comúnmente utilizadas para evaluar la citotoxicidad, sin embargo, presentan algunas desventajas en comparación a una reciente alternativa denominada plataforma de evaluación de célula viva en tiempo real IncuCyte, como:

- End-point: Los ensayos de MTT y LDH son ensayos de punto final, lo que significa que solo se puede realizar una única medición de la citotoxicidad en un momento específico. Esto no permite la monitorización continua de las células vivas en tiempo real, lo que puede limitar la detección de cambios citotóxicos a lo largo del tiempo (Riss & Moravec, 2004).
- Dificultad para evaluar cambios dinámicos: Debido a su naturaleza de punto final, los ensayos de MTT o LDH pueden no detectar cambios citotóxicos dinámicos en tiempo real, como los que pueden ocurrir en una población de células a lo largo del tiempo (Riss et al., 2004).
- Requieren la eliminación de células: En los ensayos de MTT y LDH, las células deben eliminarse del cultivo celular antes de la realización del ensayo, lo que puede interrumpir la función celular normal y afectar la precisión de los resultados (Ghasemi et al., 2021).
- Detectan solo un aspecto de la citotoxicidad: Los ensayos de MTT y LDH se basan en la detección de cambios en la viabilidad celular, pero no pueden detectar otros cambios citotóxicos, como cambios en la morfología celular, la apoptosis o la necrosis, los que si pueden ser detectados por la plataforma IncuCyte (Riss et al., 2004).
- No es posible observar células individuales: Los ensayos de MTT y LDH proporcionan información sobre la población de células en general, pero no permiten la observación de células individuales, lo que puede limitar la

capacidad de detectar heterogeneidades en la respuesta celular (Ghasemi et al., 2021).

Dentro de los estudios de citotoxicidad de nanomateriales dentales de uso oral, algunos estudios han evaluado la toxicidad potencial de estos, dando resultados escasos con relación a células orales (Iavicoli et al., 2011; Schrand et al., 2010). Se han reportado resultados positivos (Jadhao et al., 2020; Zhang et al., 2013), demostrando ser nanomateriales biocompatibles y sin efectos citotóxicos o mutagénicos significativos. Por ejemplo, Zhang *et al.*, estudiaron la biocompatibilidad de la incorporación de AgNPs en un adhesivo como material de restauración oral en fibroblastos gingivales humanos. El material no indujo ninguna citotoxicidad y mejoró el efecto antibacteriano (Zhang et al., 2013). Así, las NPs pueden utilizarse clínicamente como agentes antimicrobianos en odontología sin ser perjudiciales para el hospedero (Bapat et al., 2019). Por el contrario, Liu *et al.*, examinaron la citotoxicidad de los nanomateriales de plata y cobre en células epiteliales gingivales humanas. Los resultados mostraron que la exposición a las nanopartículas de plata y cobre a concentraciones elevadas redujo la viabilidad celular y aumentó la liberación de enzimas intracelulares, indicando un efecto citotóxico en el tejido oral (Liu et al., 2010).

En general, estos resultados controversiales, que podrían estar relacionados al estado de funcionalización de los nanomateriales, nos indican que aún se

necesitan más estudios para evaluar la citotoxicidad y seguridad a largo plazo de estos materiales.

2.9. Células del ligamento periodontal (*human periodontal ligament cells* (hPDLC))

El ligamento periodontal es un tejido blando conectivo embebido entre el cemento (capa delgada de tejido mineralizado que cubre la raíz del diente) y el hueso alveolar, que no sólo tiene un papel importante en el soporte del diente, sino que también contribuye a la nutrición, propiocepción, homeostasis y reparación de tejido dañado (Shimono et al., 2003). Se ha estudiado que el ligamento periodontal es esencial para la regeneración de los tejidos periodontales debido a que contiene una población heterogénea de células, incluyendo fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, células epiteliales, células endoteliales vasculares, células del músculo liso y algunos tipos de células neuronales (Mu et al., 2017). Estas células, poseen un alto potencial de auto renovación y pluripotencia, por lo que pueden servir como células semillas en la regeneración ósea. La presencia de múltiples tipos de células ha llevado a la hipótesis de que el ligamento periodontal (LPD) también puede contener células madre que mantienen la homeostasis y regeneran los tejidos periodontales adyacentes (Jung et al., 2019). Las células madre mesenquimales multipotenciales contenidas en los tejidos del LPD son esenciales para la remodelación continua del periodonto, así como para la respuesta de curación a la lesión (Jung et al., 2019). Después de una adecuada desinfección y obturación del sistema de

conductos, la resolución de una infección endodóntica o lesión osteolítica requiere de un cambio inmunológico complejo, remodelación del tejido granulomatoso y reclutamiento y diferenciación de osteoblastos. Si los materiales endodónticos, entran en contacto directo con los tejidos perirradiculares durante periodos prolongados de tiempo, pueden causar irritación y retardar la cicatrización de los tejidos (Jung et al., 2019). Por estas razones las hPDLc proporcionan una alternativa adecuada, para evaluar efectos citotóxicos de diversos materiales endodónticos.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En consideración con los antecedentes descritos, es que surgen las siguientes preguntas de investigación:

Un nanogel nanoestructurado de cobre y/o plata ¿Presentará actividad antibacteriana frente a una biopelícula endodóntica bacteriana multiespecie y será biocompatible con células humanas del ligamento periodontal humano (hPDLC) en terapias endodónticas *ex vivo*?

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

En terapias de desinfección endodóntica *ex vivo*, un nanogel nanoestructurado de cobre y/o plata, presenta actividad antibacteriana frente a una biopelícula endodóntica bacteriana multiespecie y son biocompatibles sobre células humanas del ligamento periodontal humano (hPDLC).

4.2. Objetivos

4.3. Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana y biocompatibilidad de un nanogel nanoestructurado de cobre y plata, utilizados como desinfección en neoterapias endodónticas *ex vivo*.

4.4. Objetivos específicos

- 1) Cuantificar la actividad antibacteriana de nanogeles nanoestructurados sobre biopelículas endodónticas bacterianas multiespecies *ex vivo*.
- 2) Determinar la biocompatibilidad en tiempo real de nanogeles nanoestructurados sobre células humanas del ligamento periodontal humano (hPDLC) *ex vivo*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se detalla la metodología de este estudio de laboratorio experimental llevada a cabo para la evaluar la actividad bacteriana de dos nanogeles de plata y cobre mediante la determinación de la cinética de muerte por el test de contacto directo frente a *Enterococcus faecalis* UDEC C3 por triplicado. Además, se aplicaron criterios de inclusión para seleccionar 1 nanogel de cada metal, seleccionando el nanogel que presentó mayor actividad bactericida en el tiempo y que en su composición presentaba menor concentración del agente estabilizador (polivinilpirrolidona/alcohol polivinílico (PVP/PVA)). Posteriormente, se describe la cuantificación de la actividad antibacteriana de los nanogeles seleccionados, frente a un modelo de biopelícula multiespecie, seleccionando 2 campos aleatorios de cada triplicado, y, finalmente, la evaluación de la biocompatibilidad de estos nanogeles al colocarlos en contacto con células humanas del ligamento periodontal humano, el cual se llevó a cabo por triplicado.

5.1. Materiales

5.1.1. Nanogeles de cobre y de plata

Los nanogeles metálicos testeados fueron sintetizados y proporcionados por el Departamento de Ingeniería de Materiales de la facultad de Ingeniería de la

Universidad de Concepción, a través de la alumna de Doctorado María Elizabeth Berrio Niño (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las características de los nanogeles de cobre y plata, utilizados en este estudio. **Fuente: elaboración propia.**

Nanopartículas	Precursor	Concentración	Concentración	Método de obtención	Denominación
		Precursor	Agente estabilizante PVP/PVA		
Plata	AgNO ₃	1.0mM	0.6mM/0.5mM	1 Paso	Ag1S
Cobre	CuSO ₄	1.0mM	0.6mM/0.5mM	1 Paso	Cu1S
Plata	AgNO ₃	1.0mM	0.15mM/0.3mM	2 Pasos	Ag2S
Cobre	CuSO ₄	1.0mM	0.15mM/0.3mM	2 Pasos	Cu2S

5.1.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- *Streptococcus sanguinis* American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, USA) 10556™.
- *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.
- *Prevotella melaninogenica* ATCC® 25845™.
- *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.
- *Veillonella parvula* ATCC® 10790™.
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™

- *E. faecalis* UDEC C3 (cepa clínica, aislada de una lesión endodóntica persistente, identificada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con partidores específicos de la especie (Sánchez-Sanhueza et al., 2015), y luego corroborada por secuenciación del 16S rRNA con un 98 % identificación según el número de referencia NCBI KJ803877.1 (Sacoto-Figueroa et al., 2021).
- *Cutibacterium acnes* UDEC A1 (cepa clínica, aislada de una lesión endodóntica persistente, identificada por secuenciación del 16S rRNA con un 98% identificación según el número de referencia NCBI KP944184.1 (Sacoto-Figueroa et al., 2021).

5.1.3. Dientes

Se recolectaron de pacientes, 21 dientes permanentes humanos (18 se utilizaron en actividad antibacteriana y 3 para citotoxicidad) con indicación de exodoncia previo a consentimiento informado (CEC-SSC: 20-10-55), en el servicio de urgencia de Facultad de Odontología de la Universidad de Concepción. Se realizó la decoronación de 18 dientes mediante el uso de un disco de diamante de baja velocidad (ContacEz, Vancouver, EE.UU.) a 1 mm bajo límite amelocementario. Posteriormente las raíces se embebieron en una matriz de acrílico transparente, las cuales fueron cortadas paralelo al eje mayor de cada raíz mediante una sierra de diamante de precisión de baja velocidad (ISOMET Buehler, Lake Bluff, IL, EE.UU.), obteniendo cortes de 0,5 mm de espesor y un largo de 5 mm. Los especímenes se lavaron con EDTA al 18% durante 15 min

en ultrasonido para eliminar el detritus generado en el proceso de corte del diente (*smear layer*), y, posteriormente fueron esterilizados por autoclave. Luego, se preincubaron a 37°C en caldo tripticasa de soya (TSB) para garantizar la ausencia de contaminación bacteriana. Además, se utilizaron 3 dientes uni o biradicales extraídos de diversos pacientes (entre 18 y 25 años de edad) por indicación de extracción por tratamiento ortodóntico (premolares sin caries o enfermedad periodontal) e inmediatamente después de la extracción se extrajo el tejido periodontal remanente (Rebolledo et al., 2023).

5.1.4. Células humanas del ligamento periodontal

Las células humanas se cultivaron según protocolos estandarizados. Los dientes se lavaron 3 veces con solución buffer (PBS) para eliminar restos de sangre y se separaron cuidadosamente el ligamento periodontal del tercio medio de la raíz dentro de la primera hora de la extracción dental con un bisturí estéril. Luego, el tejido se trituró en pequeños trozos con un bisturí e incubado con tripsina por 30 min. para disgregar las células de forma individual. Posterior a esto, el tejido se resuspendió en medio completo y homogenizado de manera mecánica. Se dejaron decantar los trozos de tejido y se sembró el sobrenadante en placas de 100 mm para establecer el cultivo. Las células se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM, HyClone) suplementado con 10% suero bovino fetal (HyClone), 2 mmol/L de glutamina (Gibco, Life Technologies), 100 UI/mL de penicilina (Gibco, Life Technologies), 100 µg/mL de estreptomina (Gibco, Life Technologies), y 0,25 µg/mL de anfotericina B (Gibco, Life Technologies), en una atmósfera

humidificada de 95% de aire y 5% de CO₂ a 37 ° C. El medio de cultivo fue cambiado cada 2 a 3 días. La confluencia celular y/o posible contaminación, fueron monitoreados cada 2-3 días bajo el microscopio óptico invertido previo a los experimentos. En una primera etapa, las células se cultivaron en placas de 100 mm a una confluencia de 80-90%. Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron expandidas a placas nuevas mediante disgregación con tripsina. Para realizar los experimentos de muerte, proliferación y confluencia celular, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos hasta alcanzar un 30 a 40% de confluencia con un máximo de 5 a 8 pasajes.

5.2. Metodología

5.2.1. Test modificado de contacto directo

Se realizó la prueba modificada de contacto directo para evaluar la cinética de muerte de *E. faecalis* UDEC C3 frente a los nanogeles de cobre y plata (Zhang et al., 2009). Para mantener la esterilidad, los ensayos se llevaron a cabo en una cabina de seguridad biológica de tipo A2 de la serie 1200 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se preparó una placa de 96 pocillos para realizar un ensayo de contacto directo por triplicado para las muestras durante 60, 120 min y un control de arrastre. En cada pocillo se depositó 20 µL de nanogeles, con la ayuda de una espátula estéril. A continuación, se agregó 10 µL de la dilución bacteriana y se incubaron a 37 °C en 100% de humedad durante 60 y 120 min. Para el recuento de UFC, se añadieron 220 µL de caldo de soja

tripticosa (TSB) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a cada pocillo. Tras mezclar suavemente con una micropipeta durante 1 min, la suspensión bacteriana de cada pocillo se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se diluyó en serie 4 veces en agua destilada estéril (desde 10^{-1} hasta 10^{-4}). Para cuantificar las UFC, las placas Petri con TSA (Oxoid, Basingstoke, UK) fueron divididas en cinco partes, y se sembró en cada una, 3 a 4 gotas, correspondientes a 20 μ L de la suspensión sin diluir y de 4 diluciones en serie. Luego las placas se incubaron a 37°C durante 24 h, para realizar posteriormente, el recuento de colonias, con un contador de colonias (BOECO, Alemania). Los datos obtenidos fueron multiplicados por el factor de dilución correspondiente, y los gráficos se realizaron en función logarítmica o mediante porcentajes de sobrevivencia. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, se consideró que un nanomaterial presentaba un efecto bacteriostático, cuando la disminución del inóculo fue $>2 \text{ Log}_{10}$ y $<3 \text{ Log}_{10}$ y un efecto bactericida cuando la disminución era $\geq 3 \text{ log}_{10}$ (Miranda et al., 2020; Zhang et al., 2009).

5.2.2. Análisis de la biopelícula bacteriana multiespecies mediante microscopía confocal de barrido láser (confocal laser scanning microscopy (CLSM)).

5.2.2.1. Formación de biopelícula bacteriana ex vivo.

Todas las cepas mencionadas en el punto 4.1.2, se cultivaron individualmente en placas de agar anaerobio con sangre de oveja desfibrinada al 5% con 1 ml/L de

hemina y 1 ml/L de vitamina K, y se incubaron en anaerobiosis a 37 °C entre 7 y 14 días. Posteriormente, se seleccionó una colonia de cada agar y se inocularon en tubos independientes a 37 °C con 5 ml de caldo anaerobio fastidioso (Laboratory M, Bury, UK). Finalmente, se estandarizaron los inóculos bacterianos a 0.5 McFarland (1×10^8 UFC/ml) midiendo la turbidez por medio de un turbidímetro (Oxoid, Basingstoke, UK). La suspensión preparada se diluyó a 1:10 obteniendo una concentración final de inóculo de 10^7 UFC/ml. Luego, se depositaron una alícuota de 500 μ L de cada suspensión bacteriana en una placa de 24 pocillos que contiene secciones de dentina de 0,5 mm de espesor en triplicados separados, los cuales fueron incubados en condiciones anaeróbicas a 37°C por 21 días, el medio de cultivo fue cambiado cada 4 días.

Al final de los 21 días, cada biopelícula de las especies bacterianas presentes fue expuesta durante 1 h, 24 h y 168 h con nanogeles de cobre y plata, en donde se usó como controles NaOCl al 5% en 1 h y Ca(OH)₂ (UltraCa® XS) por 168 h de contacto con la biopelícula madura (Boutsioukis et al., 2022; Jerez-Olate et al.; Meire & van der Waal, 2022).

5.2.2.2. Microscopia CLSM

Después del tiempo de exposición, tanto los nanogeles de cobre y plata, como los materiales de control, se removieron mediante lavados con PBS y la biopelícula formada sobre los dientes se tiñó con 100 μ L del kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen, Carlsbad, CA), el cual contiene dos

colorantes de tinción, en una relación 1:1 v/v, con una concentración de 6 μM de SYTO (fluorescencia verde que tiñe ácidos nucleicos) 9 y 30 μM de yoduro de propidio (fluorescencia roja que tiñe ácidos nucleicos). Posteriormente, los especímenes de dientes se volvieron a lavar con PBS y se detectó la emisión de fluorescencia utilizando CLSM de alta resolución espacio-temporal SP8 LIGHTNING, LEICA (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Alemania). Las longitudes de ondas excitación/emisión utilizadas fueron de 480/500 nm para la tinción de células vivas con SYTO-9 y de 490/635 nm para la tinción de células muertas con yoduro de propidio, según fabricante (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las muestras se observaron con un objetivo de inmersión en aceite de 63 \times /1.4 y se escanearon 2 campos aleatorios en cada muestra. Se capturó una pila de 20- 70 cortes en tamaños de paso de 0,3 μm , aproximadamente, a lo largo del eje Z desde la parte superior a la inferior de la biopelícula. Se adquirieron imágenes del CLSM y por medio del software IMARIS versión 7.5.2 'Measurement Pro Module' (Bitplane, Belfast, UK), se analizó cada plano por separado de cada imagen, en donde se aplicó un suavizado gaussiano con un tamaño de 0.1 μm . Se eligieron todos los lugares con intensidad sobre 8000 y se calcularon las áreas e intensidad total. Luego por cada imagen sumaron las áreas y se multiplicaron por el intervalo en Z, para obtener un volumen estimado.

Para analizar la capacidad antibacteriana de los nanomateriales en contacto con

la biopelícula multiespecie y madura, se midió la biomasa total, viable y no viable, indicando la proporción de células muertas de los grupos de tratamiento.

5.2.3. Evaluación de Biocompatibilidad

Durante los experimentos, las hPDLC fueron cultivadas con los nanogeles de cobre y/o plata por 3 días según los siguientes grupos experimentales y controles, cada uno en triplicado (n=3):

Grupos experimentales:

- Grupo 1: Ag1S + hPDLC
- Grupo 2: Cu1S + hPDLC
- Grupo 3: Ag2S + hPDLC
- Grupo 4: Cu2S + hPDLC

Grupos controles:

- Grupo 5 (Negativo): hPDLC cultivadas sin nanomateriales

Se cuantificó la proliferación, la muerte celular y la confluencia utilizando la microscopía de célula viva en tiempo real mediante IncuCyte S3, con aumento 10x. Los datos se analizaron desde 0 h hasta completar 72 h de cultivo.

5.3. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos para comparar la actividad antibacteriana de los distintos nanomateriales en la curva de cinética de muerte se expresaron como la media

y la desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza mediante ANOVA de dos vías multifactorial y una prueba posthoc de Tukey de comparaciones múltiples, para verificar diferencias específicas entre los nanomateriales y tiempos, con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

En relación a los datos obtenidos en los ensayos de actividad antibacteriana frente a una biopelícula bacteriana multiespecie, estos se expresaron como la media y la desviación estándar del promedio de los porcentajes de células muertas (volumen de células muertas/volumen células vivas + volumen células muertas*100), luego se realizó ANOVA de dos vías multifactorial y una prueba posthoc de Tukey de comparaciones múltiples, para comprobar diferencias de los distintos nanomateriales aplicados a distintos tiempos sobre la biopelícula bacteriana multiespecie madura ($p < 0,05$). Un segundo análisis se realizó con los datos obtenidos anteriormente, expresados como mediana y rango de los volúmenes de biomasa de células vivas y muertas a 1 h y a 168 h de actividad del nanomaterial y controles, en donde se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis y una prueba post hoc de Dunn's de comparaciones múltiples. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Para los ensayos de biocompatibilidad, los datos obtenidos de las imágenes de IncuCyte S3 se utilizaron para analizar muerte celular, los cuales se expresaron en la media de porcentaje y desviación estándar de células teñidas con el agente Sytox Green. En relación con proliferación se analizaron la media y la desviación estándar de la proporción de células finales: células iniciales, el último parámetro

de análisis fue el porcentaje de confluencia expresado en media y desviación estándar. Luego se realizaron ANOVA de dos vías multifactorial y una prueba posthoc de Dunnett's de comparaciones múltiples, para verificar diferencias en muerte celular, proliferación y confluencia de las células humanas del ligamento periodontal a 4 tiempos de evaluación en contacto con los nanogeles (0, 24, 48 y 72 h) en comparación con el control (células humanas del ligamento periodontal sin material) ($p < 0,05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el Software Graphpad Prism 8.

6. RESULTADOS

6.1. Test modificado de contacto directo modificado.

6.1.1. Ensayo de cinética de muerte.

Los resultados del test de contacto directo modificado se observan en la Figura 1 y 2. Los valores de media y de la desviación expresados \log_{10} UFC mL⁻¹ están representados en la tabla 2.

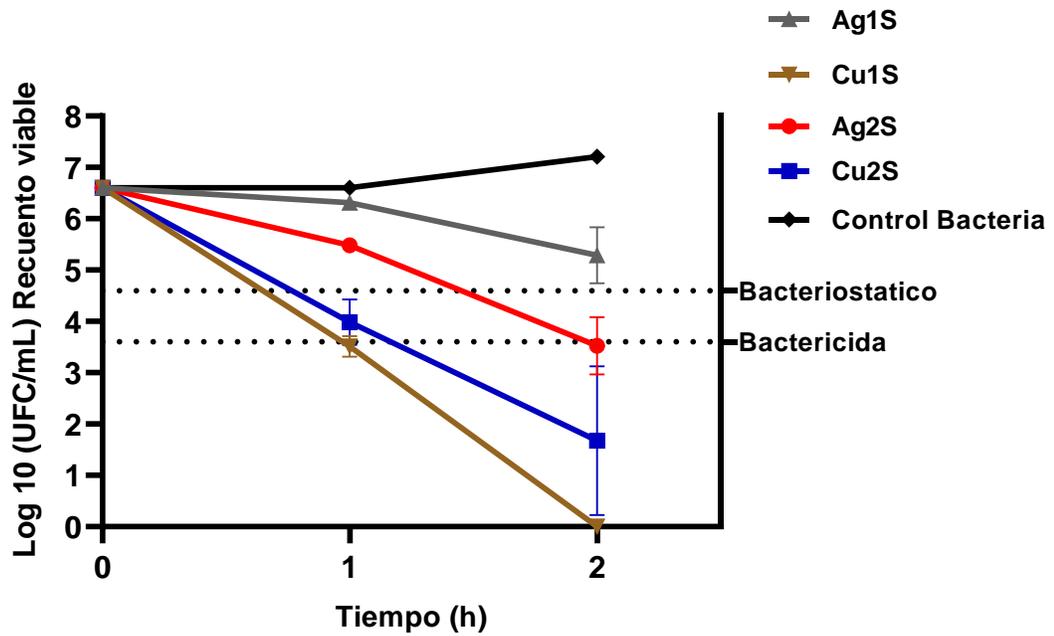


Figura. 1 Gráfico de cinética de muerte de distintos nanomateriales frente a *E. faecalis*. Ag1S (nanogel de plata de 1 paso con concentración alta de PVP/PVA), Cu1S (nanogel de cobre de 1 paso con concentración alta de PVP/PVA), Ag2S (nanogel de plata de dos pasos con concentración media de PVP/PVA), Cu2S (nanogel de cobre de dos pasos con concentración media de PVP/PVA). **Fuente:** elaboración propia.

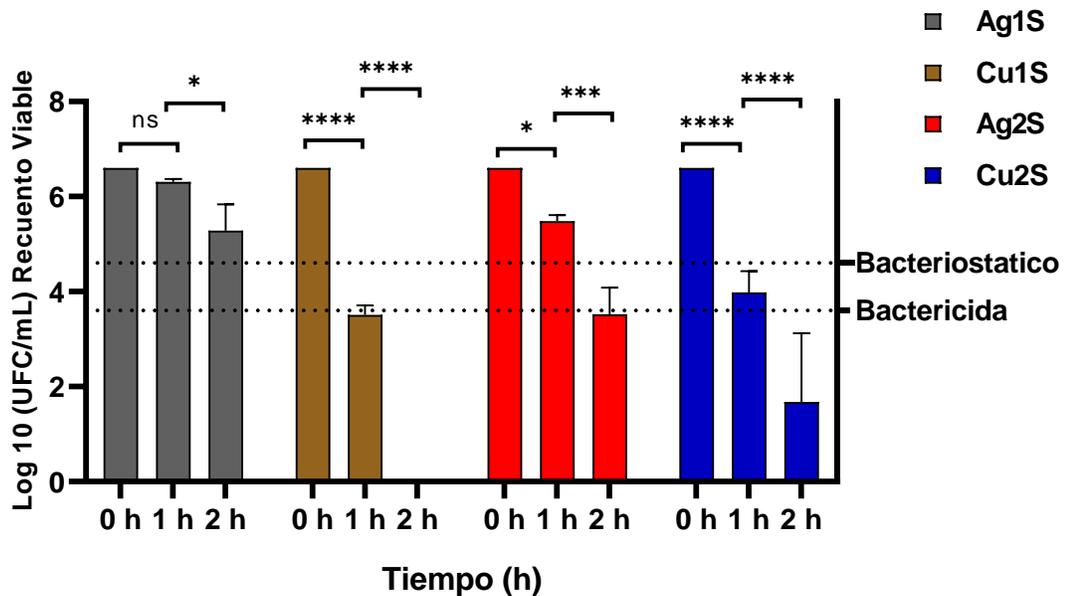


Figura. 2 Grafico comparativo de actividad antibacteria de nanomateriales con distintas concentraciones de PVP/PVA a distintos tiempos de actividad ANOVA de dos vías, prueba de tukey $p < 0,05$. ns (sin diferencia significativa), * ($p= 0,0282$), *** ($p=0,0002$), **** ($p <0,0001$). Ag1S: nanogel de plata de 1 paso, Cu1S: nanogel de cobre de 1 paso, Ag2S: nanogel de plata de 2 pasos, Cu2S: nanogel de cobre de 2 pasos. **Fuente: elaboración propia.**

La concentración inicial del cultivo de *E. faecalis* fue de 4×10^6 UFC/mL ($6,602 \log_{10}$ UFC mL⁻¹). El control positivo presentó un ligero aumento de \log_{10} UFC a lo largo del tiempo (2 h, $7,207 \pm 0,042$). Sin embargo, la acción de los nanogeles Ag1S, Ag2S y Cu1S, Cu2S a 1 h de acción frente al cultivo bacteriano disminuyó los valores en \log_{10} UFC a $6,311 \pm 0,056$, $5,480 \pm 0,129$ y $3,512 \pm 0,198$, $3,985 \pm 0,443$, \log_{10} UFC mL⁻¹, respectivamente, en donde ambos nanogeles de cobre presentaron una rápida disminución del inóculo, CuS1 presentando acción

bactericida y CuS₂ bacteriostática al disminuir aproximadamente en 3 y 2 unidades logarítmicas, respectivamente, presentando diferencias significativas con el control y los nanogeles de plata ($p < 0,05$). Por el contrario, ambos nanogeles de plata no presentaron una actividad antibacteriana significativa sobre el inóculo, ya que la reducción en log₁₀ UFC fue de aproximadamente 1 unidad logarítmica, a pesar de que Ag₂S presentó una diferencia significativa ($p = 0,0326$) en relación con el control (sin tratamiento). Al pasar 2 h se observaron cambios en el recuento bacteriano en donde nanogeles de cobre Cu₁S, Cu₂S y Ag₂S ($0 \pm 0 \log_{10}$ UFC $1,674 \pm 1,450 \log_{10}$ UFC y $3,527 \pm 0,558 \log_{10}$ UFC, respectivamente) presentaron actividad bactericida debido a una disminución mayor a 3 unidades logarítmicas. Cabe destacar que, aunque los tres nanogeles presentaron actividad antibacteriana similar, los nanogeles de cobre provocaron una mayor disminución del recuento bacteriano en el tiempo que el nanogel de plata ($p < 0.0001$ y $p = 0.0002$) (Figura. 1).

Al analizar la actividad de los nanogeles en el tiempo por separado, todos presentaron una disminución en el recuento bacteriano como se mencionó anteriormente, sin embargo, Ag₁S no presentó actividad sobre el inóculo en el tiempo, por el contrario, Cu₁S redujo a cero el inóculo. Es importante mencionar, que Cu₁S ($p < 0,0001$), Cu₂S ($p < 0,0001$) y Ag₂S ($p = 0,0282$, $p = 0,0002$) presentaron diferencias significativas entre 0 h y 1 h, 1 h y 2 h de tiempo, respectivamente (Figura 2).

Tabla 2. Tabla resumen de los promedios y desviación estándar de la actividad antibacteriana de nanomateriales a distintos tiempos. **Fuente: elaboración propia.**

Material	0h (Media ± SD)	1h (Media ± SD)	2h (Media ± SD)
Actividad antibacteriana		Sin Actividad	Sin Actividad
Ag1S	6,602	6,311 ± 0,056	5,286 ± 0,549
Actividad antibacteriana		Bactericida	Bactericida
Cu1S	6,602	3,512 ± 0198	0 ± 0
Actividad antibacteriana		Sin Actividad	Bactericida
Ag2S	6,602	5,480 ± 0,129	3,527 ± 0,558
Actividad antibacteriana		Bacteriostático	Bactericida
Cu2S	6,602	3,985± 0,443	1,674 ± 1,450
Actividad antibacteriana		Sin Actividad	Sin Actividad
Control Bacteria	6,602	6,602	7,207 ± 0,042

SD: desviación estándar, Ag1S: nanogel de plata de 1 paso, Cu1S: nanogel de cobre de 1 paso, Ag2S: nanogel de plata de 2 pasos, Cu2S: nanogel de cobre de 2 pasos.

En base a estos resultados, se pudo establecer que los nanogeles con mayor actividad antibacteriana en el tiempo fueron Ag2S y Cu1S, sin embargo, al aplicar el criterio de inclusión para seleccionar 1 nanogel de cada metal, la selección de los nanogeles varió. Este criterio de inclusión se basó en la evaluación de la actividad antibacteriana del agente estabilizador PVP/PVA de cada nanogel con concentración alta y media (Cu1S y Cu2S, respectivamente) (Figura. 3).

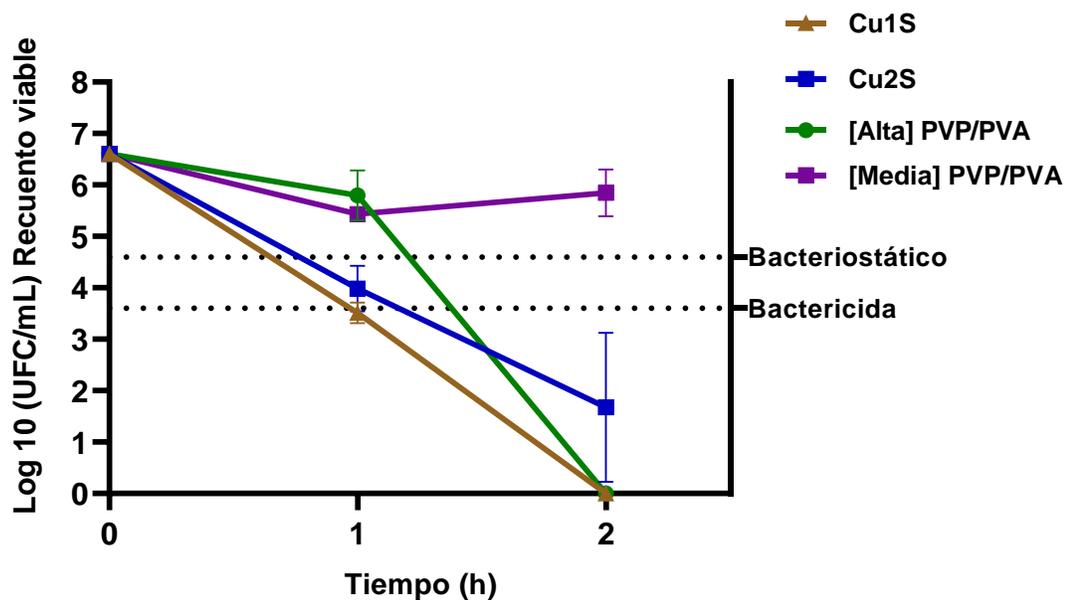


Figura. 3 Gráfico comparativo de actividad antibacteriana de nanogeles de cobre. Cu1S (nanogel de cobre de 1 paso con concentración alta de PVP/PVA), Cu2S (nanogel de cobre de dos pasos con concentración media de PVP/PVA), [Alta] PVP/PVA (estabilizador concentración alta), [Media] PVP/PVA (estabilizador concentración media). **Fuente: elaboración propia.**

En este sentido, se observó que la concentración más alta del PVP/PVA presentó actividad bactericida a lo largo del tiempo, sin la presencia de las NPs, a su vez, al comparar su efecto con el nanomaterial Cu1S, el cual está compuesto por este estabilizador más la nanopartícula, no presentó diferencias significativas entre ellos ($p > 0,9999$). Por el contrario, la concentración media de PVP/PVA no

presentó actividad antibacteriana, a su vez, se observaron diferencias al comparar la actividad bactericida con Cu₂S ($p < 0,0001$) (Figura. 3). Por estas razones se seleccionaron Ag₂S y Cu₂S, los cuales tienen actividad bactericida en el tiempo y que en su composición presentan menor concentración del agente estabilizador, sin actividad antibacteriana por sí solo, los cuales fueron utilizados en la siguiente etapa.

6.2. Análisis de la biopelícula bacteriana multiespecies mediante CLSM.

Los resultados de la actividad antibacteriana de los nanogeles de cobre y plata (Cu₂S y Ag₂S, respectivamente) a distintos tiempos de acción se muestran en la figura 4 y tabla 3; se obtuvo el promedio y desviación estándar de los porcentajes de volumen de biomasa de células muertas, para luego comparar su variación en el tiempo.

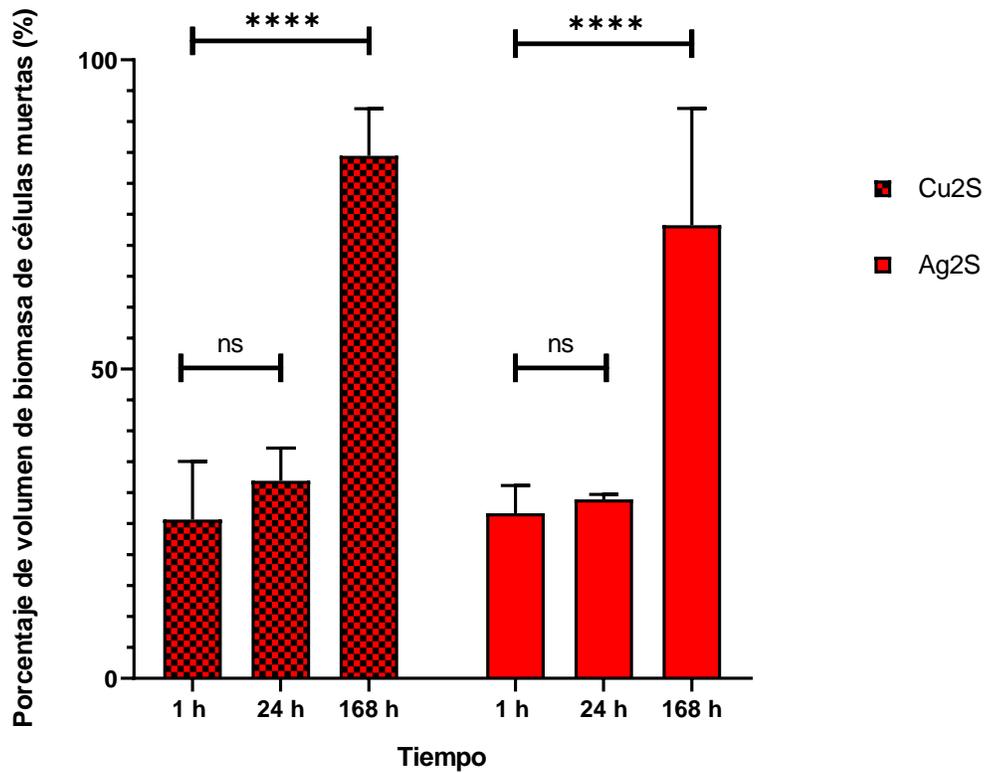


Figura. 4 Gráfico de porcentaje del volumen de biomasa de células muertas de biopelícula multiespecie madura frente a nanogeles Cu2S y Ag2S a 1 h, 24 h y 168 h de acción. Ag1S: nanogel de plata de 1 paso, Cu1S: nanogel de cobre de 1 paso, Ag2S: nanogel de plata de 2 pasos, Cu2S: nanogel de cobre de 2 pasos. **Fuente: elaboración propia.**

Tabla 3. Tabla resumen de los promedios y desviación estándar del porcentaje de células muertas en el tiempo. **Fuente:** elaboración propia.

	1 h	24 h	168 h
Cu₂S	25,7% ± 9,4	31,9% ± 5.3	84,5% ± 7.7
1 h	-	p=0,5018 (ns)	p <0,0001(****)
24 h	p=0,5018 (ns)	-	p <0,0001(****)
168 h	p <0,0001(****)	p <0,0001(****)	-
Ag₂S	26,7%± 4.5	29,0% ± 0,8	73,3% ± 18,9
1 h	-	p=0,9114 (ns)	p <0,0001(****)
24 h	p=0,9114 (ns)	-	p <0,0001(****)
168 h	p <0,0001(****)	p <0,0001(****)	-

Al analizar los datos obtenidos, se puede observar que ambos nanogeles presentaron un aumento en el porcentaje de volumen de biomasa de células muertas en el tiempo, desde 1 h hasta 168 h de aplicación, Cu₂S tanto porcentaje a 1 h y a 168 h (25,7% ± 9,4 y 84,5% ± 7.7, respectivamente), por su parte Ag₂S (26,7%± 4.5 y 73,3% ± 18,9, respectivamente), presentando diferencias significativas ($p < 0,0001$). Sin embargo, al comparar los tiempos de acción de 1h y 24 h, Cu₂S y Ag₂S, respectivamente, no hubo diferencias significativas en los porcentajes de ambos nanogeles ($p = 0,5018$ y $p = 0,9114$). La actividad de los

nanogeles presentó un mayor porcentaje de volumen de células muertas a las 168 h $84,5\% \pm 7,7$ para Cu₂S y $73,3\% \pm 18,9$ para Ag₂S (figura. 4).

En la figura 5, se observa los resultados obtenidos mediante microscopia confocal de la biopelícula multiespecie madura en contacto con Cu₂S y Ag₂S en el tiempo, la cual fue teñida con kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contiene dos colorantes de tinción, SYTO 9 que emite fluorescencia verde (células vivas o viables) y de ioduro de propidio, que emite fluorescencia roja (células muertas o no viables). Se observa que a medida que aumenta el tiempo de acción de ambos nanogeles, se muestra un aumento en la fluorescencia roja (volumen de biomasa de células muertas), al contrario de lo que sucede con la fluorescencia verde (volumen de biomasa de células vivas), observándose una disminución de ésta.

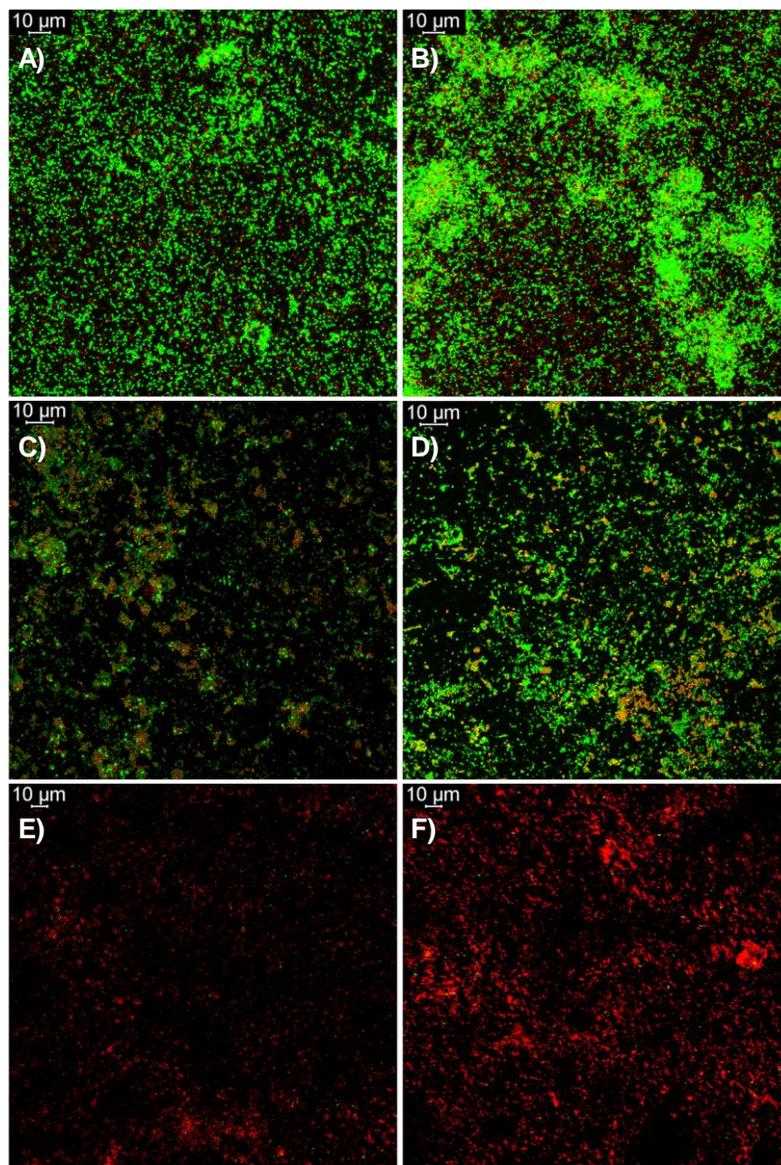


Figura. 5 Reconstrucción de imágenes 2D obtenidas en microscopía confocal de biopelículas tratadas con nanogeles de plata y cobre a 1 h, 24 h y 168 h. Ag₂S A) a 1 h, C) 24 h, E) 168 h de acción. Cu₂S B) a 1 h, D) 24 h, y F) 168 h de acción. **Fuente: elaboración propia.**

Posteriormente, se analizó el cambio de volúmenes de biomasa de células vivas y muertas producidos luego de la acción de los nanogeles por 1 h y 168 h en contacto con la biopelícula multiespecie madura. Los resultados de la prueba Kruskal Wallis identificaron el efecto del nanomaterial y el tiempo sobre volumen de biomasa de células vivas y muertas, para 1 h de acción $H(4)= 19,50$, $p= 0.0002$ y $H(4)= 18,84$, $p=0,0003$, respectivamente; Para 168 h de acción $H(4)= 19.17$, $p = 0,0003$ y $H(4)= 13,56$, $p=0,0036$, respectivamente. Además, se comparó estos resultados con controles (NaOCl, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y control con bacterias).

Los análisis post hoc llevados a cabo con el estadístico de Dunn están descritos en la tabla 4 y graficados en la figura 6. Estos resultados mostraron que el nanogel Cu_2S a 1 h y a 168 h de acción presentó menor volumen de biomasa de células vivas ((Mdn= $8995 \mu\text{m}^3$) y (Mdn= $3104 \mu\text{m}^3$), respectivamente) que el control con bacterias (Mdn= $39009 \mu\text{m}^3$, $p= 0,0142$) IC 95% [23124, 57333], en cambio al compararlos con Ag_2S a 1 h y 168 h no presenta diferencias de volumen ((Mdn= $29871 \mu\text{m}^3$, $p= 0,0659$) IC 95% [25085, 33573] y (Mdn= $6227\mu\text{m}^3$, $p=0,7751$) IC 95% [-583,5, 15670], respectivamente). A su vez, con el control NaOCl (Mdn= $0,3957 \mu\text{m}^3$, $p=0,1305$) IC 95% [0,2377,0,3957], Cu_2S no presenta diferencias en el volumen de biomasa de células vivas, lo contrario ocurre con el control $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a las 168 h de acción (Mdn= $3,25 \mu\text{m}^3$, $p=0,0373$) IC 95% [1,238, 5,762], donde Cu_2S presenta mayor volumen. En relación con Ag_2S a 1 h y a 168 h de acción, presento mayor volumen de biomasa de células vivas (Mdn= $29871 \mu\text{m}^3$ y Mdn= $6227 \mu\text{m}^3$, respectivamente) que el control NaOCl

(Mdn= 0,3957 μm^3 , $p=0,0008$) IC 95% [0,2377,0,3957], sin embargo, al comparar los resultados con el volumen del control (biopelícula sin tratamiento) a 1 h no presentan diferencias en volumen ($p=0,5399$), pero a las 168 h de acción Ag2S (Mdn=6227 μm^3) presenta menor volumen que el control con bacterias (Mdn= 39009 μm^3 , $p= 0,0455$).

Por otro lado, al analizar los resultados del volumen de biomasa de células muertas, Ag2S (Mdn= 11020 μm^3), el cual posee un mayor volumen que Cu2S (Mdn=2761 μm^3 , $p= 0,0275$) IC 95% [1211, 4808] y que el control NaOCl (Mdn= 0,3957 μm^3 , $p=0,1305$) IC 95% [-14,52, 1710] a 1 h de acción, y, a las 168 h con el control $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Mdn= 1,2 μm^3) IC 95% [1,112, 1,221], sin embargo, no presenta diferencias de volumen con el control bacteria a 1 h y 168 h ($p=0,8065$, $p=0,4614$, respectivamente).

Cu2S, por su parte, a 1 h y a 168 h (Mdn=2761 μm^3 , Mdn= 16355 μm^3 , respectivamente) mostró menor volumen al compararlo con el control bacteria ((Mdn= 12007 μm^3 , $p= 0,0143$) IC 95% [3066, 33486] y (Mdn= 12007 μm^3 , $p= 0,7126$) IC 95% [3066, 33486], respectivamente). A su vez, presentó mayor volumen de células muertas que los controles, sin diferencias al compararlo con NaOCl a 1 h ($p=0,2207$), en cambio, a las 168 h si hubo diferencias con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($p=0,0032$) .

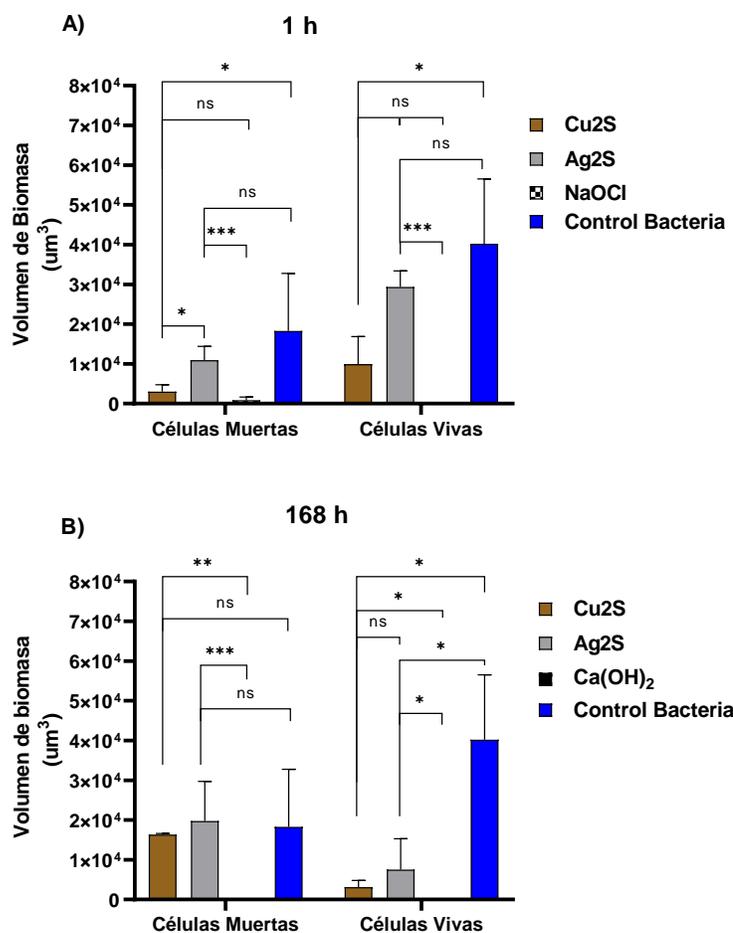


Figura. 6 Gráfico comparativo de volúmenes de biomasa de células vivas y muertas de biopelículas multiespecie madura en contacto con nanogeles Cu2S y Ag2S a 1 h y 168 h. Prueba Kruskal Wallis ($p < 0.05$). Prueba post hoc de Dunn's a 1 hora, ns (sin diferencias significativas), *(Cu2S vs Ag2S, $p=0,0275$) (Cu2S vs Control, $p= 0,0143$), *** (Ag2S vs NaOCl, $p= 0,0006$), a 168 h, ns (sin diferencias significativas), *(Cu2S vs Control, $p= 0,0222$) (Cu2S vs Ca(OH)₂, $p= 0,0372$) (Ag2S vs Control, $p= 0,0455$) (Ag2S vs Ca(OH)₂, $p= 0,0179$), ** ($p= 0,0032$), *** ($p=0,0009$). Fuente: elaboración propia.

Tabla 4. Comparación de volumen de biomasa de células vivas y muertas (μm^3) entre nanomateriales y controles a 1 hora y 7 días de acción. **Fuente:** elaboración propia.

	Cu2S 1h Mdn(rango)	Ag2S 1h Mdn(rango)	NaOCl 1h Mdn(rango)	Control Mdn(rango)	H	p
Vol. biomasa células vivas	8995 (9,667)	29871 (17,17)	0,3 (3,5)	39009 (19,67)	19,50	0,0002
Vol. Biomasa células muertas	2761 (9)	11020 (18)	681,9 (4)	12007 (19)	18,84	0,0003
	Cu2S 168 h Mdn(rango)	Ag2S 168 h Mdn(rango)	Ca(OH)₂ 168 h Mdn(rango)	Control Mdn(rango)	H	p
Vol. biomasa células vivas	3104 (12)	6227 (13,17)	3,25 (3,5)	39009 (21,33)	19.17	0,0003
Vol. Biomasa células muertas	16355 (15,5)	21231 (17)	1,2 (3,5)	12007 (14)	13,56	0,0036

Mdn: mediana, H: valor de χ^2 de la prueba Kruskal Wallis, p: nivel de significancia

6.3. Evaluación de biocompatibilidad

Los resultados obtenidos de la metodología realizada para evaluar biocompatibilidad de los distintos nanogeles al aplicarlos en células humanas obtenidas de ligamento periodontal en el tiempo (0 h, 24 h, 48 h y 72 h) en comparación con el control sin material, se observan en los gráficos de la figura 7 y en la tabla 4, se dan a conocer el resumen de los análisis estadísticos realizados de la media y desviación estándar del % de células muertas, proliferación y % de confluencia. Además, en la figura 8, se observan las imágenes obtenidas de la plataforma de tiempo real IncuCyte de células humanas del ligamento periodontal en contacto con los distintos nanogeles.

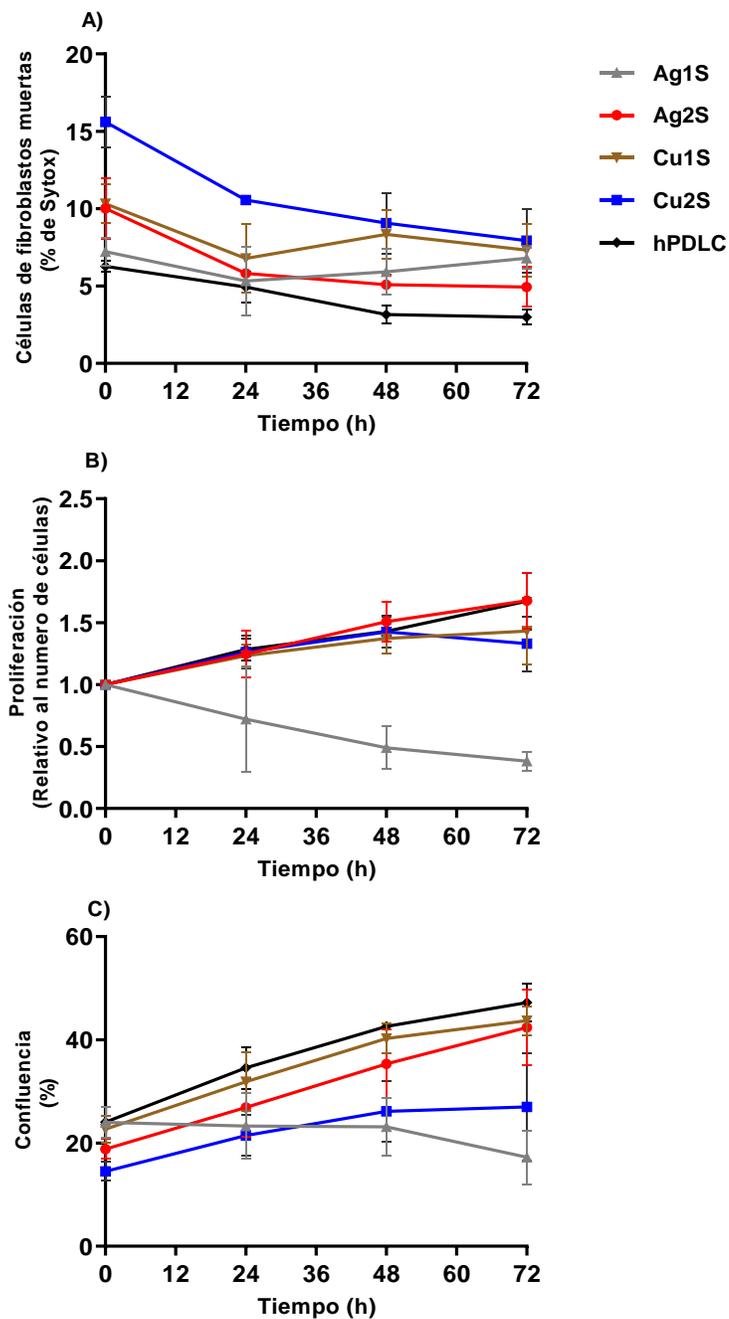


Figura. 7 Gráfico comparativo de porcentaje de células muertas, Proliferación celular y porcentaje de confluencia de células humanas del ligamento periodontal en contacto con nanogeles de 0 h a 72 h. **Fuente:** elaboración propia.

Tabla 5. Análisis estadístico de promedio de porcentaje de células muertas (Sytox Green), proliferación y porcentaje de confluencia de los resultados de las imágenes obtenidas de IncuCyte. **Fuente: elaboración propia.**

Ag1S			Ag2S			
	% Células muertas	Proliferación (C. finales/C. iniciales)	% Confluencia	% Células muertas	Proliferación (C. finales/C. iniciales)	% Confluencia
0 h	7,2%±0,9(ns)	1,00±0,00(ns)	24,0%±3,0(ns)	10,0%±2,0^^	1±0(ns)	18,8%±2,0(ns)
24 h	5,3%±2,2(ns)	0,72±0,43***	23,3%±6,4*	5,8%±0,1(ns)	1,25±0,19(ns)	26,9%±5,6(ns)
48 h	5,9%±1,5(ns)	0,49±0,17****	23,1%±5,7****	5,1%±0,7(ns)	1,51±0,16(ns)	35,4%±6,7(ns)
72 h	6,8%±0,7**	0,38±0,08****	17,3%±5,2****	4,9%±1,3(ns)	1,68±0,22(ns)	42,4%±7,3(ns)

Cu1S			Cu2S			
	% Células muertas	Proliferación (C. finales/ C. iniciales)	% Confluencia	% Células muertas	Proliferación (C. finales/C. iniciales)	% Confluencia
0 h	10,3%±1,3 ^{xx}	1±0(ns)	22,7%±2,6(ns)	15,6%±1,6 ^{****}	1±0(ns)	14,5%±1,9(ns)
24 h	6,8%±2,2(ns)	1,23±0,09(ns)	31,9%±5,7(ns)	10,6%±0,2 ^{****}	1,26±0,13(ns)	21,5%±3,9 ⁺⁺
48 h	8,3%±1,6 ^{xxx}	1,37±0,12(ns)	40,3%±2,9(ns)	9,1%±2,0 ^{****}	1,43±0,13(ns)	26,1%±5,9 ⁺⁺⁺
72 h	7,3%±1,7 ^{xx}	1,43±0,27(ns)	43,7%±2,8(ns)	7,9%±2,1 ⁺⁺⁺	1,33±0,22(ns)	27,0%±10,3 ^{****}

Control			
	% Células muertas	Proliferación (C. finales/ C. iniciales)	% Confluencia
0 h	6,3%±0,3	1±0	24,1%±3,0
24 h	4,9%±1,0	1,28±0,09	34,6%±4,1
48 h	3,2%±0,6	1,43±0,13	42,6%±0,3
72 h	3,0%±0,5	1,67±0,23	47,2%±3,7

Anova de dos vías, prueba post hoc de Dunnett's, porcentaje de células muertas, ns (sin diferencias significativas), ** (p= 0,0067), ^^ (p= 0,0075), xx (p=0,0037, 0,0018), xxx (p= 0,0002), +++ (p= 0,0004), **** (p<0,0001). Proliferación, ns (sin diferencias significativas), xxx (p= 0,0009), xxxx (p <0,0001). Porcentaje de confluencia, ns (sin diferencias significativas), * (p= 0,0293), **** (p <0,0001), ++ (p= 0,0092), +++ (p= 0,0009), **** (p <0,0001).

En relación con el porcentaje de células muertas, las cuales presentan daño en su membrana celular al estar en contacto con los distintos nanomateriales, permitiendo la tinción de los ácidos nucleicos del núcleo celular con Sytox Green y la cuantificación por el sistema IncuCyte. Los resultados del control de células

humanas del ligamento periodontal sin material mostraron un porcentaje de muerte del $6,3\% \pm 0,3$ a 0 h, $4,9\% \pm 1,0$ a 24 h, $3,2\% \pm 0,6$ a 48 h y $3,0\% \pm 0,5$ a 72 h de observación. Al compararlos con los nanomateriales, podemos observar que Ag1S presenta un porcentaje de células muertas similar al control de 0 h a 48 h de acción ($7,2\% \pm 0,9$ 0 h ($p= 0,8212$), $5,3\% \pm 2,2$, 24 h ($p= 0,9907$), $5,9\% \pm 1,5$, 48 h ($0,0649$)), sin embargo, a las 72 h de acción el porcentaje aumenta, presentando diferencias significativas ($6,8\% \pm 0,7$, $p=0,0067$). A su vez, Ag2S, inicialmente presenta diferencias con el control con un mayor porcentaje de células muertas ($10,0\% \pm 2,0$, 0 días, $p=0,0075$), pero este porcentaje disminuye en el tiempo sin diferencias con el control ($5,8\% \pm 0,1$, 24 h ($p= 0,8511$), $5,1\% \pm 0,7$, 48 h ($p=0,2780$), $4,9\% \pm 1,3$, 72 h ($p=0,2701$). En relación con los nanogeles de cobre, Cu1S y Cu2S, estos presentan mayor porcentaje de células muertas que el control en el tiempo, en donde Cu2S muestra mayor diferencia significativa ($15,6\% \pm 1,6$, 0 h, $10,6\% \pm 0,2$, 24 h, $9,1\% \pm 2,0$, 48 h y $7,9\% \pm 2,1$ a 72 h ($p < 0,05$) (figura. 7A).

Por otro lado, los resultados de la proporción de proliferación (recuento de células finales/ células iniciales), muestran que el control presenta un aumento en la proliferación a 72 h de evaluación de $1,00 \pm 0,00$ a $1,67 \pm 0,23$. Al comparar los resultados obtenidos, Ag1S fue el único nanogel que presentó diferencias con el control a partir de las 24 h hasta las 72 h de acción, mostrando una disminución en la proliferación de $0,72 \pm 0,43$ a $0,38 \pm 0,08$, respectivamente ($p < 0,05$) (figura. 7B).

En los datos obtenidos del porcentaje de confluencia (porcentaje de superficie o imagen cubierta por células), el control presentó un aumento al pasar los días de $24,1\% \pm 3,0$ a 0 h hasta $47,2\% \pm 3,7$ a las 72 h. Ag₂S y Cu₁S no presentaron diferencias con el control ($18,8\% \pm 2,0$ a 0 h - $42,4\% \pm 7,3$ a 72 h y $22,7\% \pm 2,0$ a 0 h - $43,7\% \pm 2,8$ a 72 h, respectivamente) ($p > 0,05$). Por otro lado, Cu₂S, presentó un aumento de la confluencia en el tiempo, sin embargo, es menor al compararlo con el control ($14,5\% \pm 1,9$ a 0 h - $27,0\% \pm 10,3$ a 72 h) ($p < 0,05$). Lo contrario sucede al observar los resultados de Ag₁S, donde el porcentaje presenta una disminución en los días con diferencias significativas con el control ($24,0\% \pm 3,0$ a 0 h - $17,3\% \pm 5,2$ a 72 h) ($p < 0,05$) (figura. 7C).

En la figura 8, se puede observar las imágenes obtenidas de la plataforma de tiempo real IncuCyte, en donde el control hPDLC mostraron una morfología fusiforme, característica de los fibroblastos, la cual se mantuvo en el tiempo. Incluso, se observa un aumento en el número de células fusiformes de 0 h a 72 h (figura 8. E y T, respectivamente). Imágenes similares se observan en las hPDLC en contacto con Ag₂S, Cu₁S, Cu₂S, sin embargo, se observa un leve aumento de células pequeñas, redondeadas y con tinción verde, asociadas a muerte celular (figura 8. B-G-L-Q, C-H-M-R y D-I-N-S, respectivamente). Por el contrario, en las imágenes de Ag₁S, mostraron un aumento en el número de células pequeñas, redondeadas y teñidas de verde y un menor número de células fusiformes de 0 h a 48 h de acción (figura 8. A-F y K), pero a las 72 h se observa lo contrario (figura 8. P).

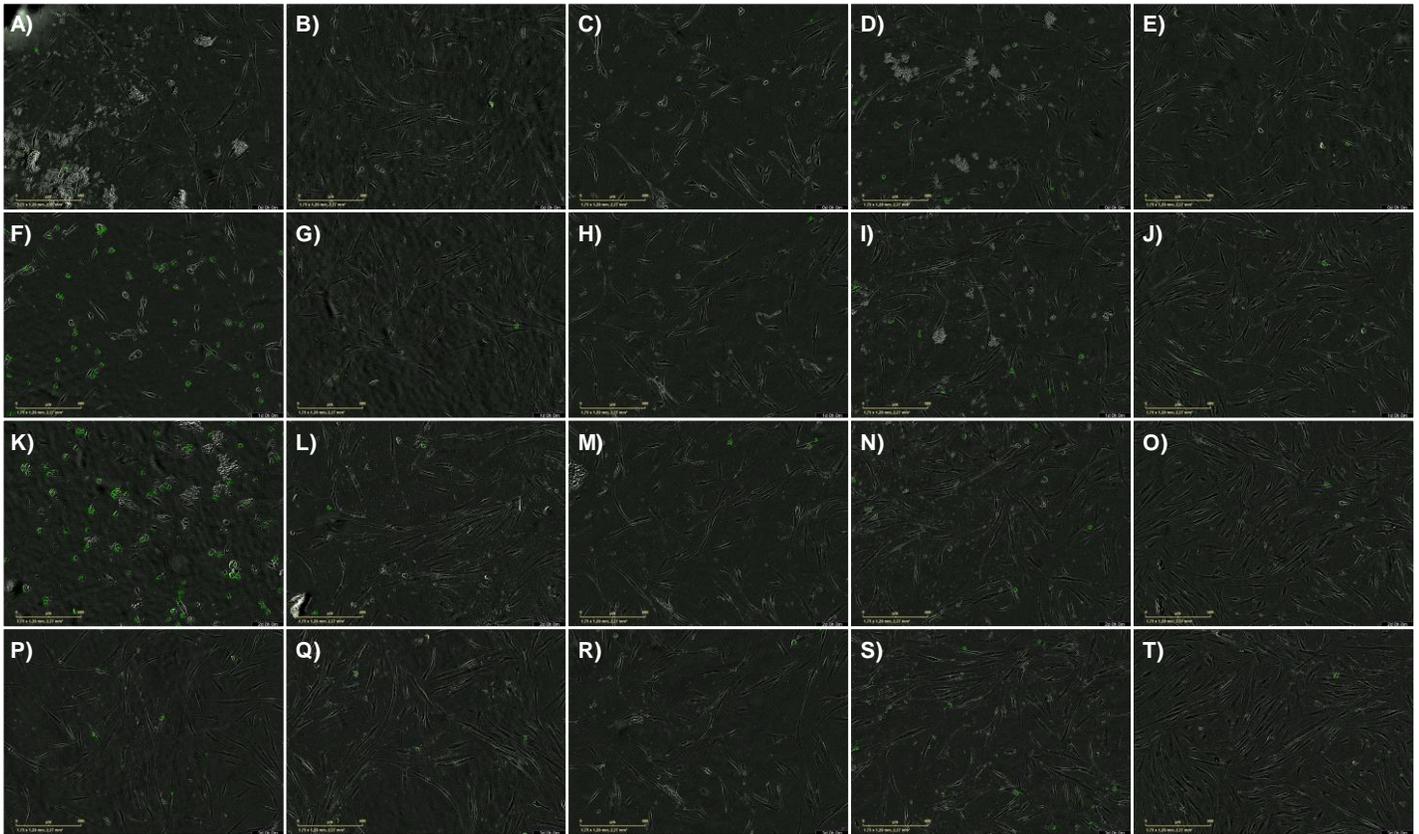


Figura. 8 Imágenes obtenidas de plataforma de tiempo real IncuCyte de células humanas del ligamento periodontal en contacto con los distintos nanogeles y control a 0 h a 72 h. Ag1S A) 0 h, F) 24 h, K) 48 h, P) 72 h de aplicación. Ag2S B) 0 h, G) 24 h, L) 48 h, Q) 72 h de aplicación. Cu1S C) 0 h, H) 24 h, M) 48 h, R) 72 h de aplicación. Cu2S D) 0 h, I) 24 h, N) 48 h, S) 72 h. Control sin material D) 0 h, J) 24 h, O) 48 h y T) 72 h de aplicación. **Fuente: elaboración propia.**

7. DISCUSIÓN

Este estudio *ex-vivo* evaluó la actividad antibacteriana y biocompatibilidad de cuatro nanogeles (2 de cobre y 2 de plata), producidos mediante distintos métodos químicos y funcionalizadas a distintas concentraciones del agente estabilizador. Siendo el primer reporte del uso de CuNPs funcionalizadas como una posible alternativa de desinfección en endodoncia (Raura et al., 2020). El uso de AgNPs ha sido más ampliamente reportado, pero no funcionalizadas (Afkhami et al., 2023). Este proceso de funcionalización utilizando matrices poliméricas, pueden proporcionar mejoras en las propiedades a las NPs, por ejemplo, disminuir su toxicidad al utilizar polímeros inocuos y biocompatibles, mejorar la actividad antibacteriana de las NPs, al permitir la obtención de NPs de menor tamaño, distintas formas entre otros (Veerapandian & Yun, 2011).

Por esto, en primera instancia se evaluó la actividad antibacteriana de los nanogeles frente a un modelo planctónico de *E. faecalis* mediante la prueba de contacto directo modificada y curva de muerte. El objetivo de este ensayo fue seleccionar un nanogel representante de plata y de cobre, que presentara mayor actividad antibacteriana frente *E. faecalis*. Esta especie, pese a que no siempre se encuentra presente en los tratamientos fallidos, y tampoco está entre las más prevalentes (Boutsioukis et al., 2022), la característica más relevante de *E.*

faecalis es su capacidad de tolerar una amplia variedad de condiciones de crecimiento, lo que facilita enormemente su manipulación en el laboratorio, por lo que aún se utiliza para estudiar terapias de desinfección o agentes desinfectantes en endodoncia (Boutsioukis et al., 2022; Hussein & Kishen, 2020; Landzberg et al., 2021; Teed et al., 2023). Al realizar la comparación de los cuatro nanogeles frente al control, Ag₂S, Cu₁S y Cu₂S presentaron diferencias significativas y actividad bactericida a las 2 h de acción. Cu₁S mostró mayor disminución en el recuento bacteriano que Cu₂S, sin embargo, al analizar las curvas de muerte de las concentraciones medias y altas de los agentes estabilizadores de PVP/PVA (Cu₂S y Cu₁S, respectivamente), este último mostro actividad bactericida a las 2 h de acción sin presentar NPs de cobre en su composición. Además, es importante señalar que el nanogel de Ag₁S también presenta en su composición la concentración más alta de PVP/PVA, sin embargo, la interacción entre esta nanopartícula metálica y el polímero produce una actividad antibacteriana nula en el tiempo. Queda claro, que no existen un método y modelo ideal que funcione perfectamente independientemente de las condiciones y que proporcione todas las respuestas. Por lo tanto, puede ser necesario combinar dos o más ensayos complementarios teniendo en cuenta sus fortalezas y debilidades al interpretar los resultados (Boutsioukis et al., 2022; Meire & van der Waal, 2022). Por esta razón se seleccionaron los nanogeles Ag₂S y Cu₂S, para evaluar su actividad antibacteriana frente una biopelícula multiespecie.

Múltiples trabajos confirman nuestros resultados, con relación a la actividad antibacteriana tanto de nanopartículas de plata como de cobre embebidas en una matriz polimérica de PVA/PVP frente a monocultivos de cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. Por ejemplo, H Yu *et al.*, evaluaron distintas propiedades de hidrogeles de PVA/PVP que contenían diferentes concentraciones de AgNPs, en el cual dentro de las propiedades que evaluaron fue liberación de iones de plata y acción antibacteriana, las concentraciones más elevadas de NPs mostraron mayor liberación de iones plata y actividad antibacteriana (1.0% en peso) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante el test de difusión en agar (Yu et al., 2007). A su vez, Badineni *et al.*, informaron que los polímeros de PVA/PVP con AgNPs, formados mediante síntesis de reducción química, a medida que aumentaban la concentración de las AgNPs, aumentaba el halo de inhibición tanto en *S. aureus* y *E.coli* (Badineni et al., 2021). No existen registros de actividad antibacteriana de geles o hidrogeles de PVA/PVP de CuNPs, lo más próximo son estudios de nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), en el cual tanto las CuONPs con y sin PVA/PVP, presentaban actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *E.coli*, sin embargo, CuONPs combinado con polímeros de PVA/PVP, potenciaban la actividad antibacteriana, mostrando mayor actividad que CuONPs sin el agente estabilizador (Ghosh et al., 2022). Esta característica es un aspecto importante, con relación a los polímeros o estabilizadores de PVA y PVP, ya que la mayoría de los estudios mencionan que estos polímeros o matrices son inocuos, es decir

biocompatibles en los tejidos y no presentan actividad antibacteriana por sí solos (Badineni et al., 2021; El-Kader et al., 2021; Ghosh et al., 2022; Husain et al., 2018; Lebaron et al., 1998; Leone et al., 2011; Yu et al., 2007). Por otro lado, Oustadi *et al.*, crearon una bicapa basada en el polímero PVA/PVP combinado con ibuprofeno mediante ciclos de congelación/descongelación, al evaluar las propiedades antibacterianas mediante el test de difusión en agar, dio como resultado que el PVA presentaba actividad antibacteriana y el PVP no, sin embargo, la membrana de PVA/PVP/Ibuprofeno presentó mayor halo de inhibición frente a las cepas *S.aureus* y *E.coli* al compararlo con los polímeros separados (Oustadi et al., 2020). Estos resultados se contrastan con los resultados obtenidos en este estudio, y de alguna forma puede explicar porque las concentraciones más altas de PVA/PVP presentaban actividad antibacteriana, pese a no poseer NPs. No obstante, todos los estudios mencionados anteriormente presentan diferencias en su metodología de fabricación del polímero, tipo y concentración de NPs, cepas bacterianas utilizadas, por ende, se requieren estudios estandarizados para poder ser comparables los resultados. En endodoncia, es importante considerar que tanto para irrigantes como para medicamentos intraconductos, el test de difusión en agar puede afectar los resultados de los materiales evaluados, debido al desconocimiento de las interacciones químicas del material o fármaco con el medio, por ejemplo, al pH del agar, la capacidad de difusión del fármaco, entre otros, es decir este test no es idóneo para evaluar la actividad antibacteriana

(Boutsioukis et al., 2022; Editorial Board of the Journal of, 2007). En este trabajo se utilizó la prueba de contacto directo modificado propuesto por *Zhang et al.*, el cual se trata de un ensayo cuantitativo y reproducible para analizar materiales insolubles (Zhang et al., 2009).

Posteriormente, se generó la formación de una biopelícula multiespecie madura, debido a que las infecciones endodónticas son producidas por diferentes especies bacterianas que interactúan entre sí, formando este consorcio, con la intención de reproducir las condiciones que se establecen al interior del conducto radicular (Boutsioukis et al., 2022). Para esto se utilizaron bacterias Gram positivas, negativas, aerobias estrictas, facultativas, anaerobias y dos cepas clínicas aisladas de infecciones endodónticas persistentes (Meire & van der Waal, 2022). Al comparar los porcentajes de volúmenes de bacterias muertas por la aplicación a distintos tiempos de aplicación de los nanogeles en la biopelícula bacteriana multiespecie, Ag₂S y Cu₂S generaron un aumento cercano al 73% y 85%, respectivamente a las 168 h de uso, presentando diferencias significativas a medida que aumentó el tiempo de aplicación. Los nanogeles de cobre y plata no mostraron diferencias significativas en el volumen de biomasa de células muertas a las 168 h de acción al no utilizar ningún agente antibacteriano. Sin embargo, existió una disminución del volumen de biomasa de células vivas de la biopelícula. Por otro lado, el uso de Ca(OH)₂ y NaOCl, evidenció un volumen de biomasa de células muertas y vivas menor que los nanogeles evaluados.

No existen estudios que analicen actividad antibacteriana de NPs de cobre y plata con base polimérica de PVA/PVP frente a una biopelícula bacteriana multiespecie endodóntica, sin embargo, hay resultados de AgNPs frente a biopelículas endodónticas monoespecies (Hu et al., 2019) y uno de CuNPs utilizando biopelículas bacterianas endodónticas multiespecie, con resultados positivos y comparables con los obtenidos en nuestro estudio con un modelo de biopelícula multiespecie madura (Rojas et al., 2021).

En un estudio comparativo, en el cual evaluaron actividades antimicrobianas de AgNPs cubiertas por PVA (AgNPs-PVA) y farnesol (producto derivado del propóleo) frente a biopelículas de 48 h de *E. faecalis*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*, mediante ensayo de tinción cristal violeta y su cuantificación mediante absorbancia, NaOCl presentó mayor reducción de la biomasa de biopelícula en los 3 microorganismos tanto a los 3 como a los 5 minutos de aplicación, además, AgNPs-PVA fue más efectivo frente a *E. faecalis* que farnesol en ambos tiempos. Si bien frente a la biopelícula de *P.aeruginosa* presentó mayor reducción de biomasa al aumentar el tiempo de acción, no superó los resultados que se obtuvieron con farnesol (Chavez-Andrade et al., 2019).

Wu. *et al.*, estudiaron la eficacia antibacteriana de distintas concentraciones de AgNPs como irrigante (2 min de acción) y medicación (7 días de acción) frente a biopelículas monoespecie de 4 semanas de maduración formadas en dentina

radicular, utilizando microscopía confocal más la tinción de viabilidad. Según sus resultados, la irrigación con AgNPs al 0,1% a 2 min no presentó diferencias en el recuento de bacterias viables frente al control salino, a su vez, NaOCl a 2 min de acción, eliminó el mayor porcentaje de biopelícula impidiendo la determinación de viabilidad mediante CLSM. Por otra parte, las biopelículas tratadas con gel de AgNPs al 0,02% como medicamento durante 7 días mostraron diferencias significativas en el número de células viables en comparación con la concentración AgNPs al 0,01% e Ca(OH)_2 . Sin embargo, Ca(OH)_2 eliminó la mayoría de las biopelículas, mostrando una biopelícula residual con una alta proporción de células vivas. Los autores sugieren que las AgNPs deberían aplicarse como medicamento y no como irrigante para mostrar una actividad potencial contra las biopelículas bacterianas residuales durante la desinfección endodoncia (Wu et al., 2014).

Por otro lado, *Rojas et al.*, en un estudio *ex-vivo* utilizando dientes, evaluaron los efectos de CuNPs a distintos tiempos de acción frente a una biopelícula multiespecie (*E. faecalis* y *S. mutans*) temprana (48 h de maduración) comparando su acción frente a Ca(OH)_2 mediante el recuento bacteriano, los resultados mostraron que a medida que se aumenta el tiempo de acción de CuNPs (1 min a 7 días), aumenta su actividad antibacteriana disminuyendo el recuento bacteriano sin presentar diferencias significativas con el control Ca(OH)_2 (Rojas et al., 2021).

Si bien estos estudios presentan resultados similares a los obtenidos en esta investigación, en que el uso de estas NPs presenta mayor actividad al utilizarlas a las 168 h, estos presentan diferencias al compararlos con los controles NaOCl y Ca(OH)₂, mostrando diferencias menores en su capacidad antibacteriana. Esto puede deberse a la capacidad tampón de la dentina, producto de sus componentes orgánicos e inorgánicos (Meire & van der Waal, 2022). También, la edad puede afectar el crecimiento de la biopelícula tras la incubación (Ozdemir et al., 2010), produciendo una disminución de la actividad antibacteriana de estos materiales. Es más, Gomes *et al.*, mencionan que la acción de las CuNPs puede disminuir por la acción del pH, estructura de la superficie, presencia de materia orgánica, entre otras (Gomes et al., 2020). Yin *et al.*, mencionan que la acción de las AgNPs puede estar perjudicada debido al tamaño de la nanopartícula, impidiendo su difusión a través de la biopelícula, además la composición química de las NPs puede provocar acumulación de estas en la biopelícula, reduciendo su difusión, y por último, la interacción electrostática entre las bacterias y las NPs puede alterar su penetración en la biopelícula producto de la generación de NPs cargadas (Yin et al., 2020). Cabe destacar que existen diferencias en la metodología, principalmente en relación con el modelo de biopelículas (tipo de cepas bacterianas, tiempo de maduración), tipo de nanopartículas utilizadas, que pudiesen explicar los distintos resultados en los estudios.

El éxito del tratamiento endodóntico depende tanto de factores preoperatorios como es la presencia de infección, como por los factores intraoperatorios como

es una adecuada preparación quimiomecánica, para estimular un cambio en la ecología microbiana (Gulabivala & Ng, 2023). Es responsabilidad del clínico analizar estas variables e incorporarlas en la estrategia de desinfección para maximizar las posibilidades de curación. Tener una alternativa a nuestros tradicionales irrigantes y medicamentos como es NaOCl y el Ca(OH)₂, los cuales poseen desventajas intrínsecas como la toxicidad y la resistencia, sería significativamente menor que seguir contando con agentes antimicrobianos únicos (Ordinola-Zapata et al., 2022).

Actualmente frente a la amplia gama de nuevos materiales endodónticos generados por la industria, es de vital necesidad realizar ensayos experimentales, para hacer un *screening* y caracterizar los posibles efectos adversos de estos materiales en los tejidos orales (Hosseinpour et al., 2022). En nuestro estudio se utilizó una nueva plataforma de tiempo real, llamada IncuCyte, la cual permite una monitorización continua de las células en tiempo real, detectando cambios dinámicos de la población de células, sin realizar la eliminación de éstas para su análisis, en donde además permite la evaluación de múltiples parámetros tales como viabilidad, proliferación, confluencia, morfología a lo largo del tiempo (Ghasemi et al., 2021; Riss & Moravec, 2004; Riss et al., 2004). A las células humanas derivadas del ligamento periodontal se les aplicaron los distintos nanogeles y como controles se usaron las células sin ningún material, además se evaluaron los polímeros de PVA/PVP con los cuales estaban formadas estas NPs. Los resultados de este trabajo muestran que los

nanogeles de Ag₂S y Cu₁S presentaron diferencias menores al compararlos al control, tanto en porcentaje de células muertas, como en proliferación y porcentaje de confluencia. Cu₂S presentó una leve diferencia en relación con el porcentaje de células muertas, el que fue disminuyendo con el paso de los días, a su vez, éste presentó menor porcentaje de confluencia, si bien este porcentaje aumentó con el tiempo, fue menor que el control. Es importante mencionar que todos los nanomateriales presentaron a tiempo 0 algún grado de citotoxicidad, dentro de los parámetros evaluados, sin embargo, estos valores fueron disminuyendo sus diferencias con el control con el paso de los días.

Como se mencionó anteriormente, diversos estudios hacen mención que PVA/PVP son poco tóxicos frente a tejidos, no así las NPs solas (Badineni et al., 2021; El-Kader et al., 2021; Ghosh et al., 2022; Husain et al., 2018; Lebaron et al., 1998; Leone et al., 2011; Yu et al., 2007). En este sentido, nuestros resultados difieren de los estudios anteriores, en donde la concentración más alta de PVA/PVP tuvo mayor porcentaje de células muertas que el control, sin embargo, la concentración media se comportó similar que el control (material suplementario). Por otro lado, un estudio en donde evaluaron CuONPs, obtuvieron resultados similares a los nuestros, en el cual a medida que pasa el tiempo en el uso de NPs asociadas a PVA/PVP la viabilidad aumenta (El-Kader et al., 2021). Adicionalmente, en otro estudio se demostró que aumentos en la concentración de la AgNPs en matrices de PVA/PVP mostraban leves mejoras en la viabilidad de células HFB4 (Abd El-Kader et al., 2021). Si bien en este

estudio se utilizó una sola concentración de plata Ag₂S obtuvo un comportamiento similar que las células humanas del ligamento periodontal en cuanto a citotoxicidad.

8. CONCLUSIONES

Como conclusión de este trabajo de tesis:

Actualmente en la disciplina de endodoncia existe un alto índice de generación de nuevos materiales para las distintas etapas del tratamiento, es de vital importancia realizar investigaciones previas para observar y registrar el comportamiento de estos materiales para un posterior uso en humanos.

Según los resultados del presente trabajo se acepta totalmente la hipótesis planteada debido a:

1. Este es el primer reporte donde se evalúan actividad antibacteriana y biocompatibilidad de estos nanogeles de cobre y plata asociados a una matriz de PVA/PVP, además del uso de un modelo de biopelículas bacteriana endodóntica multiespecie madura y de la plataforma tiempo real IncuCyte.
2. A su vez, es importante considerar la complejidad en la reproducción exacta de una biopelícula bacteriana endodóntica multiespecie y los componentes estructurales asociadas a ellas. Por otro lado, es importante tener en cuenta estas limitaciones técnicas al utilizar líneas celulares para estudiar la biocompatibilidad. Complementar los estudios con modelos *in vivo* y sistemas más complejos, como modelos animales, puede

proporcionar una evaluación más completa y precisa de la respuesta biológica y la biocompatibilidad de un material.

3. Sin embargo, este estudio nos proporciona resultados iniciales y positivos del uso de nanogeles de cobre y plata (Ag_2S y Cu_2S), en donde mostraron mayor actividad antibacteriana a las 168 h o 7 días frente a una biopelícula bacteriana endodóntica multiespecie.
4. Asimismo, a medida que aumentan los tiempos de acción frente a las células humanas del ligamento periodontal disminuye la citotoxicidad de los nanogeles, proporcionando un material alternativo al hidróxido de calcio durante la medicación en los tratamientos de conductos.

9. PROYECCIONES

La endodoncia es un campo de la odontología que ha experimentado una creciente exploración en el uso de nanomateriales en los últimos años. A medida que se estudian y comprenden mejor los mecanismos de acción de los nanomateriales frente a las células bacterianas y eucariotas, se podría considerar su utilización en la práctica clínica. Sin embargo, para lograr esto, se requieren más estudios estandarizados y reproducibles, incluyendo modelos bacterianos mutiespecies, líneas celulares, modelos *in vivo*, tipo de nanopartículas, métodos de obtención de las nanopartículas, agentes funcionalizantes o estabilizadores, entre otros. Es necesario generar evidencia sobre los beneficios y efectos adversos del uso de estas nanopartículas, incluyendo cómo pueden comprometer las propiedades físicas y químicas de la estructura dentinaria, su biodistribución sistémica, así como evaluar la presión selectiva de microorganismos y genes de resistencia, para evitar aumentar la resistencia bacteriana. En resumen, se requiere de una evaluación cuidadosa y rigurosa de los efectos de las nanopartículas funcionalizadas en la práctica clínica de la endodoncia, antes de que puedan ser utilizadas en su totalidad.

10. GLOSARIO

Ag: Plata

Ag1S: Nanogel de plata de 1 paso

Ag2S: Nanogel de plata de 2 pasos

AgNO₃: Nitrato de plata

AgNPs: Nanopartículas de plata

ATCC: American Type Culture

Au: Oro

Ca(OH)₂: Hidróxido de calcio

CHX: Clorhexidina

CLSM: Microscopía confocal de barrido de láser

Cu: Cobre

Cu1S: Nanogel de cobre de 1 paso

Cu2S: Nanogel de cobre de 2 pasos

CuNPs: Nanopartículas de cobre

CuO: Óxido de cobre

CuSO₄: Sulfato de cobre

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

HFB4: Células de cáncer de piel

hPDLC: Células del ligamento periodontal humano

LDH: Lactato deshidrogenasa

LPD: Ligamento periodontal

MTT: Bromuro de 3- [4,5- dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio

NaOCl: Hipoclorito de sodio

NPs: Nanopartículas

OMS: Organización mundial de la salud

PBS: Buffer fosfato salino

Pd: Paladio

Pt: Platino

PVA: Polivinilalcohol

PVP: Polivinilpirrolidona

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SD: Desviación estándar

Si: Silicio

TiO₂: Óxido de titanio

TSA: Agar tripticasa de soya

TSB: Caldo tripticasa de soya

UFC: Unidades formadoras de colonias

ZnS: Sulfuro de zinc

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Kader, M. F. H., Elabbasy, M. T., Ahmed, M. K., & Menazea, A. A. (2021). Structural, morphological features, and antibacterial behavior of PVA/PVP polymeric blends doped with silver nanoparticles via pulsed laser ablation. *Journal of Materials Research and Technology*, 13, 291-300. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.04.055>
- Afkhami, F., Forghan, P., Gutmann, J. L., & Kishen, A. (2023). Silver Nanoparticles and Their Therapeutic Applications in Endodontics: A Narrative Review. *Pharmaceutics*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030715>
- Aksel, H., Mahjour, F., Bosaid, F., Calamak, S., & Azim, A. A. (2020). Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Antibiotic-Loaded Chitosan Hydrogels as a Potential Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment. *J Endod*, 46(12), 1867-1875. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.09.007>
- Al-Haddad, A., & Che Ab Aziz, Z. A. (2016). Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. *Int J Biomater*, 2016, 9753210. <https://doi.org/10.1155/2016/9753210>
- Allaker, R. P., & Memarzadeh, K. (2014). Nanoparticles and the control of oral infections. *Int J Antimicrob Agents*, 43(2), 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.11.002>
- Ameh, T., & Sayes, C. M. (2019). The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 71, 103220. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103220>
- Anderson, A. C., Al-Ahmad, A., Elamin, F., Jonas, D., Mirghani, Y., Schilhabel, M., Karygianni, L., Hellwig, E., & Rehman, A. (2013). Comparison of the bacterial composition and structure in symptomatic and asymptomatic endodontic infections associated with root-filled teeth using pyrosequencing. *PLoS One*, 8(12), e84960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084960>
- Badineni, V., Maseed, H., Arla, S. K., Yerramala, S., Vijaya Kumar Naidu, B., & Kaviyarasu, K. (2021). Effect of PVA/PVP protective agent on the formation of silver nanoparticles and its photocatalytic and antimicrobial activity. *Materials Today: Proceedings*, 36, 121-125. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.02.002>
- Bapat, R. A., Joshi, C. P., Bapat, P., Chaubal, T. V., Pandurangappa, R., Jnanendruppa, N., Gorain, B., Khurana, S., & Kesharwani, P. (2019). The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discov Today*, 24(1), 85-98. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.08.012>

- Boutsioukis, C., Arias-Moliz, M. T., & Chavez de Paz, L. E. (2022). A critical analysis of research methods and experimental models to study irrigants and irrigation systems. *Int Endod J*, *55* Suppl 2, 295-329. <https://doi.org/10.1111/iej.13710>
- Cardoso, P. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)*, *58*(260), 19-28.
- Carhuapoma, W. (2006). *Caracterización de hidrogeles de quitosano-alcohol polivinílico obtenidos por radiación gamma*. <http://dspace.ipen.gob.pe/handle/ipen/455>
- Chavez-Andrade, G. M., Tanomaru-Filho, M., Basso Bernardi, M. I., de Toledo Leonardo, R., Faria, G., & Guerreiro-Tanomaru, J. M. (2019). Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. *Arch Oral Biol*, *107*, 104481. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104481>
- Ciofu, O., Rojo-Molinero, E., Macia, M. D., & Oliver, A. (2017). Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*, *125*(4), 304-319. <https://doi.org/10.1111/apm.12673>
- Clegg, M. S., Vertucci, F. J., Walker, C., Belanger, M., & Britto, L. R. (2006). The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod*, *32*(5), 434-437. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.07.002>
- Crull, K., Rohde, M., Westphal, K., Loessner, H., Wolf, K., Felipe-Lopez, A., Hensel, M., & Weiss, S. (2011). Biofilm formation by Salmonella enterica serovar Typhimurium colonizing solid tumours. *Cell Microbiol*, *13*(8), 1223-1233. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01612.x>
- Curtis, M. A., Diaz, P. I., & Van Dyke, T. E. (2020). The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol 2000*, *83*(1), 14-25. <https://doi.org/10.1111/prd.12296>
- D'Arcangelo, C., Varvara, G., & De Fazio, P. (1999). An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod*, *25*(5), 351-353. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(06\)81170-2](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(06)81170-2)
- de Chevigny, C., Dao, T. T., Basrani, B. R., Marquis, V., Farzaneh, M., Abitbol, S., & Friedman, S. (2008). Treatment outcome in endodontics: the Toronto study--phases 3 and 4: orthograde retreatment. *J Endod*, *34*(2), 131-137. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.003>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, *15*(2), 167-193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Durán Almendárez, A. (2019). *Validación de la capacidad bactericida de aditivos basados en nanopartículas de cobre y plata para pinturas antivegetativas* [Maestra en ciencias aplicadas]. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

<http://www.fc.uaslp.mx/pca/tesis/2019Maestria/Dur%C3%A1nAlmendarezAlejandra-Maestria201990.pdf>

- Echeverri, C. E., Vallejo, C., & Londoño, M. E. (2009). Síntesis y caracterización de hidrogeles de alcohol polivinílico por la técnica de congelamiento/descongelamiento para aplicaciones médicas. *Revista EIA*, 59-66. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372009000200005&nrm=iso
- Editorial Board of the Journal of Endodontics. (2007). Wanted: a base of evidence. *J Endod*, 33(12), 1401-1402. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.09.004>
- El-Kader, M. F. H. A., Elabbasy, M. T., Adeboye, A. A., & Menazea, A. A. (2021). Nanocomposite of PVA/PVP blend incorporated by copper oxide nanoparticles via nanosecond laser ablation for antibacterial activity enhancement. *Polymer Bulletin*, 79(11), 9779-9795. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03975-5>
- Estrela, C., Sydney, G. B., Figueiredo, J. A., & Estrela, C. R. (2009). Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. *J Appl Oral Sci*, 17(1), 1-7. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572009000100002>
- Executive, B. (2019). *Antimicrobial resistance*. Geneva: World Health Organization Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/328113>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Ghosh, N., Sen, S., Biswas, G., Singh, L. R., Chakdar, D., & Haldar, P. K. (2022). A comparative study of CuO nanoparticle and CuO/PVA-PVP nanocomposite on the basis of dye removal performance and antibacterial activity in wastewater treatment. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-21. <https://doi.org/10.1080/03067319.2022.2060088>
- Gomes, B. P., Pinheiro, E. T., Gade-Neto, C. R., Sousa, E. L., Ferraz, C. C., Zaia, A. A., Teixeira, F. B., & Souza-Filho, F. J. (2004). Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*, 19(2), 71-76. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2003.00116.x>
- Gomes, I. B., Simoes, M., & Simoes, L. C. (2020). Copper Surfaces in Biofilm Control. *Nanomaterials (Basel)*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/nano10122491>
- Goncalves, L. S., Rodrigues, R. C., Andrade Junior, C. V., Soares, R. G., & Vettore, M. V. (2016). The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials. *J Endod*, 42(4), 527-532. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.12.021>

- Gulabivala, K., & Ng, Y. L. (2023). Factors that affect the outcomes of root canal treatment and retreatment-A reframing of the principles. *Int Endod J*, *56 Suppl 2*, 82-115. <https://doi.org/10.1111/iej.13897>
- Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, *41*(3), 276-301. <https://doi.org/10.1093/femsre/flux010>
- Harrison, J. W., Wagner, G. W., & Henry, C. A. (1990). Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent Clorox. *J Endod*, *16*(7), 328-330. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(06\)81943-6](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(06)81943-6)
- Hosseinpour, S., Gaudin, A., & Peters, O. A. (2022). A critical analysis of research methods and experimental models to study biocompatibility of endodontic materials. *Int Endod J*, *55 Suppl 2*(Suppl 2), 346-369. <https://doi.org/10.1111/iej.13701>
- Hu, C., Wang, L. L., Lin, Y. Q., Liang, H. M., Zhou, S. Y., Zheng, F., Feng, X. L., Rui, Y. Y., & Shao, L. Q. (2019). Nanoparticles for the Treatment of Oral Biofilms: Current State, Mechanisms, Influencing Factors, and Prospects. *Adv Healthc Mater*, *8*(24), e1901301. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901301>
- Husain, M. S. B., Gupta, A., Alashwal, B. Y., & Sharma, S. (2018). Synthesis of PVA/PVP based hydrogel for biomedical applications: a review. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, *40*(20), 2388-2393. <https://doi.org/10.1080/15567036.2018.1495786>
- Hussein, H., & Kishen, A. (2020). Antibiofilm and Immune Response of Engineered Bioactive Nanoparticles for Endodontic Disinfection. *J Clin Med*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/jcm9030730>
- Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., & Bergamaschi, A. (2011). Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *15*(5), 481-508.
- Istifli, E. S., Hüsünet, M. T., & İla, H. B. (2019). Cell division, cytotoxicity, and the assays used in the detection of cytotoxicity. *Cytotoxicity-Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds*, *1*.
- Jadhao, A. D., Shende, S., Ingle, P., Gade, A., Hajare, S. W., & Ingole, R. S. (2020). Biogenic Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles by Bryophyllum pinnatum and its Acute Oral Toxicity Evaluation in Wistar Rats. *IEEE Trans Nanobioscience*, *19*(4), 633-639. <https://doi.org/10.1109/TNB.2020.3014023>
- Jan, A. T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front Microbiol*, *8*, 1053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>
- Jerez-Olate, C., Araya, N., Alcántara, R., Luengo, L., Bello-Toledo, H., González-Rocha, G., & Sánchez-Sanhueza, G. In vitro antibacterial activity of endodontic bioceramic materials against dual and multispecies aerobic-anaerobic biofilm models. *Australian Endodontic Journal*, *n/a*(n/a). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/aej.12587>

- Jung, S., Libricht, V., Sielker, S., Hanisch, M. R., Schafer, E., & Dammaschke, T. (2019). Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers on human periodontal ligament cells ex vivo. *Odontology*, 107(1), 54-63. <https://doi.org/10.1007/s10266-018-0380-3>
- Khan, S. T., Musarrat, J., & Al-Khedhairy, A. A. (2016). Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 146, 70-83. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.046>
- Kilian, M., Chapple, I. L., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M., Tonetti, M. S., Wade, W. G., & Zaura, E. (2016). The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*, 221(10), 657-666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- Kyrychenko, A., Pasko, D. A., & Kalugin, O. N. (2017). Poly(vinyl alcohol) as a water protecting agent for silver nanoparticles: the role of polymer size and structure. *Phys Chem Chem Phys*, 19(13), 8742-8756. <https://doi.org/10.1039/c6cp05562a>
- Landzberg, G., Hussein, H., & Kishen, A. (2021). A Novel Self-Mineralizing Antibacterial Tissue Repair Varnish to Condition Root-end Dentin in Endodontic Microsurgery. *J Endod*, 47(6), 939-946. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.02.008>
- Lebaron, P., Catala, P., & Parthuisot, N. (1998). Effectiveness of SYTOX Green stain for bacterial viability assessment. *Appl Environ Microbiol*, 64(7), 2697-2700. <https://doi.org/10.1128/aem.64.7.2697-2700.1998>
- Leone, G., Consumi, M., Greco, G., Bonechi, C., Lamponi, S., Rossi, C., & Magnani, A. (2011). A PVA/PVP hydrogel for human lens substitution: Synthesis, rheological characterization, and in vitro biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 97(2), 278-288. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31813>
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu Rev Microbiol*, 64, 357-372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, H. C., Wang, T., Liao, C. Y., Cui, L., Zhou, Q. F., Yan, B., & Jiang, G. B. (2010). Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology*, 4(3), 319-330. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.483745>
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Tam, P. K., Chiu, J. F., & Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem*, 12(4), 527-534. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0208-z>
- Lopes, H. P., & Siqueira, J. F. (2021). *Endodoncia: biología y técnica*. Santos. <https://books.google.cl/books?id=XweWzqEACAAJ>
- Manoil, D., Al-Manei, K., & Belibasakis, G. N. (2020). A Systematic Review of the Root Canal Microbiota Associated with Apical Periodontitis: Lessons from Next-Generation Sequencing. *Proteomics Clin Appl*, 14(3), e1900060. <https://doi.org/10.1002/prca.201900060>

- Meire, M. A., & van der Waal, S. V. (2022). A critical analysis of research methods and experimental models to study intracanal medicaments. *Int Endod J*, *55 Suppl 2*, 330-345. <https://doi.org/10.1111/iej.13694>
- Miranda, C., Castano, J., Valdebenito-Rolack, E., Sanhueza, F., Toro, R., Bello-Toledo, H., Uarac, P., & Saez, L. (2020). Copper-Polyurethane Composite Materials: Particle Size Effect on the Physical-Chemical and Antibacterial Properties. *Polymers (Basel)*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/polym12091934>
- Mohammadi, Z. (2008). Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J*, *58*(6), 329-341. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2008.tb00354.x>
- Mohammadi, Z., & Dummer, P. M. (2011). Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*, *44*(8), 697-730. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x>
- Moreno, S., Parra, B., Botero, J. E., Moreno, F., Vásquez, D., Fernández, H., Alba, S., Gallego, S., Castillo, G., & Contreras, A. (2017). Microbiota periodontal y microorganismos aislados de válvulas cardiacas en pacientes sometidos a cirugía de reemplazo de válvulas en una clínica de Cali, Colombia. *Biomédica*, *37*, 516-525. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572017000400516&nrm=iso
- Mu, S., Guo, S., Wang, X., Zhan, Y., Li, Y., Jiang, Y., Zhang, R., & Zhang, B. (2017). Effects of deferoxamine on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Mol Med Rep*, *16*(6), 9579-9586. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7810>
- Nel, A. E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., & Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*, *8*(7), 543-557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
- Ng, Y. L., Mann, V., & Gulabivala, K. (2008). Outcome of secondary root canal treatment: a systematic review of the literature. *Int Endod J*, *41*(12), 1026-1046. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01484.x>
- Ordinola-Zapata, R., Noblett, W. C., Perez-Ron, A., Ye, Z., & Vera, J. (2022). Present status and future directions of intracanal medicaments. *Int Endod J*, *55 Suppl 3*(Suppl 3), 613-636. <https://doi.org/10.1111/iej.13731>
- Oustadi, F., Haghbin Nazarpak, M., Mansouri, M., & Ketabat, F. (2020). Preparation, characterization, and drug release study of ibuprofen-loaded poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl pyrrolidone) bilayer antibacterial membrane. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *71*(1), 14-23. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798437>
- Ozdemir, H. O., Buzoglu, H. D., Calt, S., Stabholz, A., & Steinberg, D. (2010). Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old

- human root canal dentin: in vitro study. *J Endod*, 36(5), 842-846. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.01.008>
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 73(6), 1712-1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Pinheiro, E. T., Gomes, B. P., Ferraz, C. C., Teixeira, F. B., Zaia, A. A., & Souza Filho, F. J. (2003). Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*, 18(2), 100-103. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2003.00058.x>
- Pladisai, P., Ampornaramveth, R. S., & Chivatxaranukul, P. (2016). Effectiveness of Different Disinfection Protocols on the Reduction of Bacteria in *Enterococcus faecalis* Biofilm in Teeth with Large Root Canals. *J Endod*, 42(3), 460-464. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.12.016>
- Priyank, H., Pandey, V., Bagul, A., Majety, K. K., Verma, P., & Choudhury, B. K. (2017). Evaluation of 4% Sodium Hypochlorite in eliminating *Enterococcus faecalis* from the Root Canal when Used with Three Irrigation Methods: An in vitro Study. *J Contemp Dent Pract*, 18(3), 214-217.
- Qiu, K., Durham, P. G., & Anselmo, A. C. (2018). Inorganic nanoparticles and the microbiome. *Nano Research*, 11(10), 4936-4954. <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2137-2>
- Raura, N., Garg, A., Arora, A., & Roma, M. (2020). Nanoparticle technology and its implications in endodontics: a review. *Biomater Res*, 24(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00198-z>
- Rebolledo, S., Alcantara-Dufeu, R., Luengo Machuca, L., Ferrada, L., & Sanchez-Sanhueza, G. A. (2023). Real-time evaluation of the biocompatibility of calcium silicate-based endodontic cements: An in vitro study. *Clin Exp Dent Res*. <https://doi.org/10.1002/cre2.714>
- Ren, G., Hu, D., Cheng, E. W., Vargas-Reus, M. A., Reip, P., & Allaker, R. P. (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents*, 33(6), 587-590. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004>
- Ricucci, D., & Siqueira, J. F., Jr. (2010). Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*, 36(8), 1277-1288. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.007>
- Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol*, 2(1), 51-62. <https://doi.org/10.1089/154065804322966315>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M.

- Glicksman, K. Gorshkov, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, Jr., Y. Wang, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia, & X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Rocas, I. N., & Siqueira, J. F., Jr. (2012). Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*, 50(5), 1721-1724. <https://doi.org/10.1128/JCM.00531-12>
- Rodriguez Nunez, Y. A., Castro, R. I., Arenas, F. A., Lopez-Cabana, Z. E., Carreno, G., Carrasco-Sanchez, V., Marican, A., Villasenor, J., Vargas, E., Santos, L. S., & Duran-Lara, E. F. (2019). Preparation of Hydrogel/Silver Nanohybrids Mediated by Tunable-Size Silver Nanoparticles for Potential Antibacterial Applications. *Polymers (Basel)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/polym11040716>
- Rojas, B., Soto, N., Villalba, M., Bello-Toledo, H., Melendrez-Castro, M., & Sanchez-Sanhueza, G. (2021). Antibacterial Activity of Copper Nanoparticles (CuNPs) against a Resistant Calcium Hydroxide Multispecies Endodontic Biofilm. *Nanomaterials (Basel)*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/nano11092254>
- Rosen, E., Tsesis, I., Elbahary, S., Storzi, N., & Kolodkin-Gal, I. (2016). Eradication of *Enterococcus faecalis* Biofilms on Human Dentin. *Front Microbiol*, 7, 2055. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02055>
- Rudramurthy, G. R., Swamy, M. K., Sinniah, U. R., & Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. *Molecules*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070836>
- Sacoto-Figueroa, F. K., Bello-Toledo, H. M., Gonzalez-Rocha, G. E., Luengo Machuca, L., Lima, C. A., Melendrez-Castro, M., & Sanchez-Sanhueza, G. A. (2021). Molecular characterization and antibacterial activity of oral antibiotics and copper nanoparticles against endodontic pathogens commonly related to health care-associated infections. *Clin Oral Investig*, 25(12), 6729-6741. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03959-9>
- Sakamoto, M., Rocas, I. N., Siqueira, J. F., Jr., & Benno, Y. (2006). Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*, 21(2), 112-122. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00270.x>
- Salas-Orozco, M., Niño-Martínez, N., Martínez-Castañón, G.-A., Méndez, F. T., Jasso, M. E. C., & Ruiz, F. (2019). Mechanisms of Resistance to Silver Nanoparticles in Endodontic Bacteria: A Literature Review. *Journal of Nanomaterials*, 2019, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2019/7630316>
- Samiei, M., Davaran, S., Davari, A., & Lotfipour, F. (2014). Antibacterial efficacy of silver-crosslinked hydrogel nanocomposite versus sodium hypochlorite and chlorhexidine on *enterococcus faecalis* for use in root canal infection. 2316-2332.

- Sanchez-Sanhueza, G., Bello-Toledo, H., Gonzalez-Rocha, G., Goncalves, A. T., Valenzuela, V., & Gallardo-Escarate, C. (2018). Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using Next-generation sequencing. *Int Endod J*, 51(12), 1336-1348. <https://doi.org/10.1111/iej.12953>
- Sánchez-Sanhueza, G., González-Rocha, G., Dominguez, M., & Bello-Toledo, H. (2015). Enterococcus spp. isolated from root canals with persistent chronic apical periodontitis in a Chilean population. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 14(3), 240-245. <https://doi.org/10.1590/1677-3225v14n3a13>
- Schrand, A. M., Rahman, M. F., Hussain, S. M., Schlager, J. J., Smith, D. A., & Syed, A. F. (2010). Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2(5), 544-568. <https://doi.org/10.1002/wnan.103>
- Schwendicke, F., Lamont, T., & Innes, N. (2018). Removing or Controlling? How Caries Management Impacts on the Lifetime of Teeth. *Monogr Oral Sci*, 27, 32-41. <https://doi.org/10.1159/000487829>
- Shahcheraghi, S. H., Schaffie, M., & Ranjbar, M. (2018). Development of an electrochemical process for production of nano-copper oxides: Agglomeration kinetics modeling. *Ultrason Sonochem*, 44, 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.024>
- Shimono, M., Ishikawa, T., Ishikawa, H., Matsuzaki, H., Hashimoto, S., Muramatsu, T., Shima, K., Matsuzaka, K., & Inoue, T. (2003). Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech*, 60(5), 491-502. <https://doi.org/10.1002/jemt.10290>
- Shrestha, A., & Kishen, A. (2016). Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod*, 42(10), 1417-1426. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.021>
- Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology*, 16(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>
- Siqueira, J. F., Jr., Antunes, H. S., Rocas, I. N., Rachid, C. T., & Alves, F. R. (2016). Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. *PLoS One*, 11(9), e0162887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162887>
- Siqueira, J. F., Jr., Machado, A. G., Silveira, R. M., Lopes, H. P., & de Uzeda, M. (1997). Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of Enterococcus faecalis from the root canal, in vitro. *Int Endod J*, 30(4), 279-282. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1997.00096.x>
- Siqueira, J. F., Jr., & Rocas, I. N. (2005). Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol*, 43(7), 3314-3319. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3314-3319.2005>

- Siqueira, J. F., Jr., Rocas, I. N., Ricucci, D., & Hulsmann, M. (2014). Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J*, 216(6), 305-312. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.200>
- Siqueira, J. F., Jr., Rocas, I. N., Souto, R., de Uzeda, M., & Colombo, A. P. (2000). Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 89(6), 744-748. <https://doi.org/10.1067/moe.2000.106576>
- Song, W., & Ge, S. (2019). Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061033>
- Sunde, P. T., Olsen, I., Debelian, G. J., & Tronstad, L. (2002). Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod*, 28(4), 304-310. <https://doi.org/10.1097/00004770-200204000-00011>
- Teed, C., Hussein, H., & Kishen, A. (2023). Synchronized Microbubble Photodynamic Activation to Disinfect Minimally Prepared Root Canals. *J Endod*, 49(2), 198-204. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2022.12.003>
- Thanh, N. T. K., & Green, L. A. W. (2010). Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, 5(3), 213-230. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.05.003>
- Upadya, M., Shrestha, A., & Kishen, A. (2011). Role of efflux pump inhibitors on the antibiofilm efficacy of calcium hydroxide, chitosan nanoparticles, and light-activated disinfection. *J Endod*, 37(10), 1422-1426. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.06.017>
- Vallet-Regi, M., Gonzalez, B., & Izquierdo-Barba, I. (2019). Nanomaterials as Promising Alternative in the Infection Treatment. *Int J Mol Sci*, 20(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153806>
- Vargas-Reus, M. A., Memarzadeh, K., Huang, J., Ren, G. G., & Allaker, R. P. (2012). Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. *Int J Antimicrob Agents*, 40(2), 135-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.012>
- Veerapandian, M., & Yun, K. (2011). Functionalization of biomolecules on nanoparticles: specialized for antibacterial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90(5), 1655-1667. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3291-6>
- Venkatesan, N., Perumal, G., & Doble, M. (2015). Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol*, 10(11), 1743-1750. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.69>
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*, 69(1), 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>
- Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J. L., & Fan, B. (2014). Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*, 40(2), 285-290. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022>
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in

- Dentistry. *Int J Nanomedicine*, 15, 2555-2562.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
- Yu, H., Xu, X., Chen, X., Lu, T., Zhang, P., & Jing, X. (2007). Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 103(1), 125-133.
<https://doi.org/10.1002/app.24835>
- Zandi, H., Kristoffersen, A. K., Orstavik, D., Rocas, I. N., Siqueira, J. F., Jr., & Enersen, M. (2018). Microbial Analysis of Endodontic Infections in Root-filled Teeth with Apical Periodontitis before and after Irrigation Using Pyrosequencing. *J Endod*, 44(3), 372-378.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.11.019>
- Zhang, H., Shen, Y., Ruse, N. D., & Haapasalo, M. (2009). Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, 35(7), 1051-1055.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.04.022>
- Zhang, K., Li, F., Imazato, S., Cheng, L., Liu, H., Arola, D. D., Bai, Y., & Xu, H. H. (2013). Dual antibacterial agents of nano-silver and 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide in dental adhesive to inhibit caries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 101(6), 929-938.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.32898>

12. ANEXOS

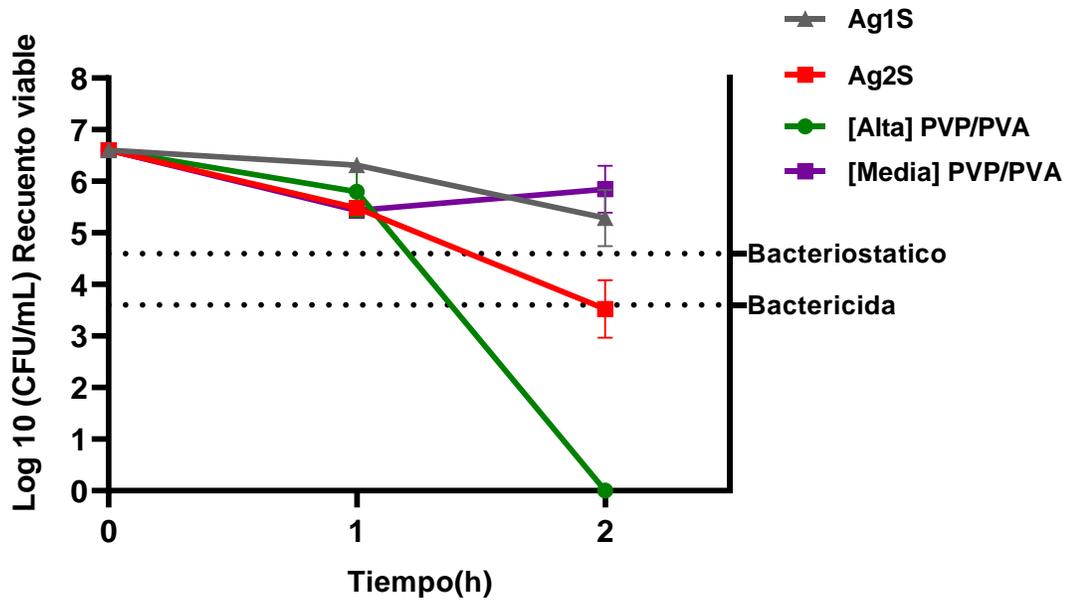


Figura 9. Gráfico comparativo de actividad antibacteriana de nanomateriales de plata Ag1S (nanomaterial de plata con concentración alta de PVP/PVA), Ag2S (nanomaterial de plata con concentración media de PVP/PVA), [Alta] PVP/PVA (estabilizador concentración alta), [Media] PVP/PVA (estabilizador concentración media). Ag1S: nanogel de plata de 1 paso, Ag2S: nanogel de plata de 2 pasos. **Fuente: elaboración propia.**

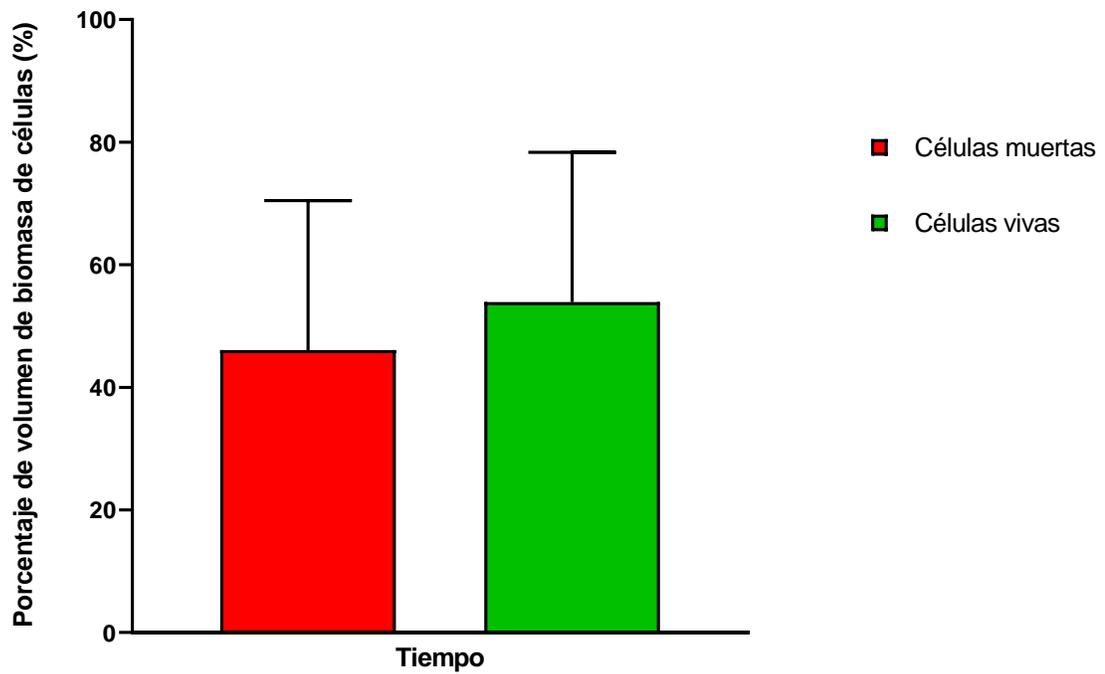


Figura 10. Gráfico de porcentaje del volumen de biomasa de células muertas y vivas de biopelícula multiespecie a 21 días de maduración sin material (Control Bacteria). Porcentaje de volumen de biomasa de células muertas (barra de color rojo), Porcentaje de volumen de biomasa de células vivas (barra de color verde). **Fuente: elaboración propia.**

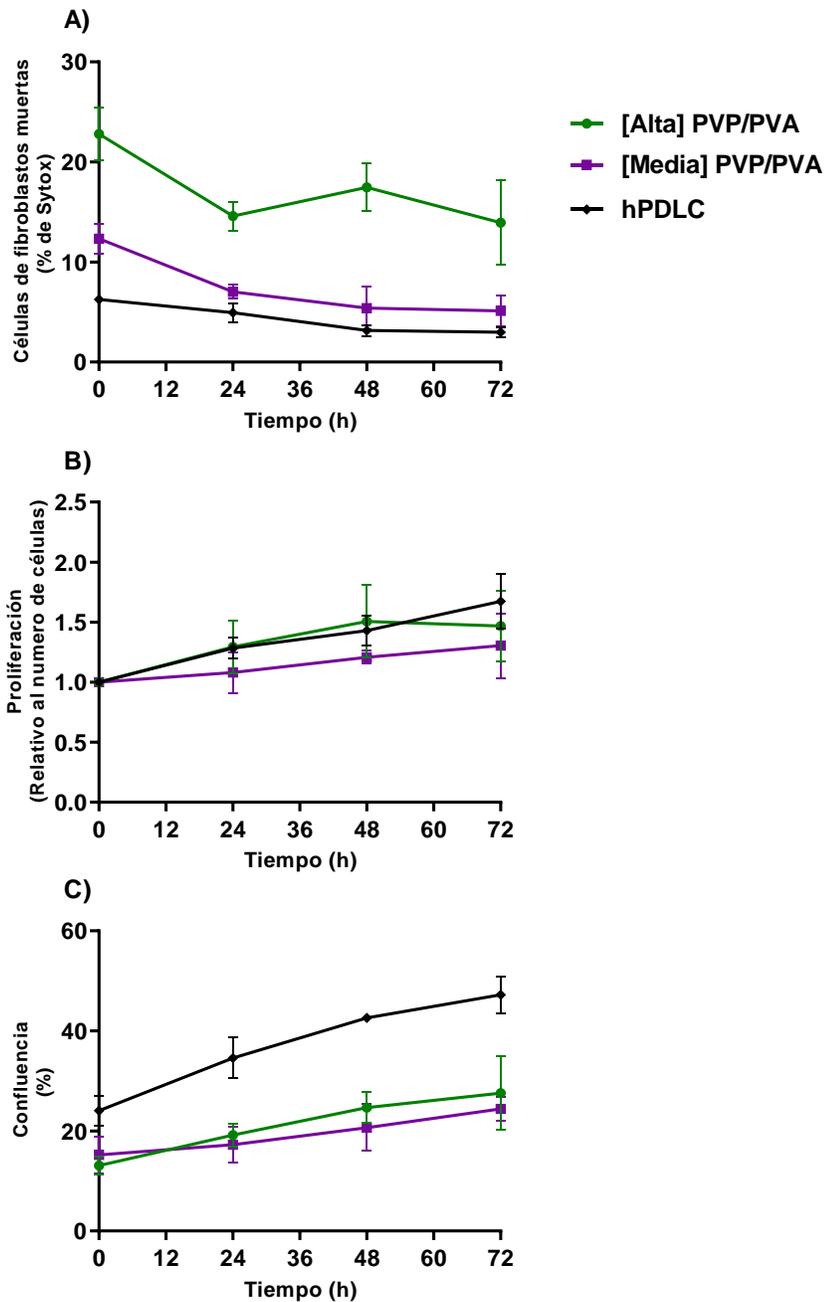


Figura. 11 Gráfico comparativo de porcentaje de células muertas, proliferación celular y porcentaje de confluencia de hPDLC en contacto con los agentes funcionalizadores de concentración media y alta de 0 h a 72 h. [Alta] PVP/PVA (estabilizador concentración alta), [Media] PVP/PVA (estabilizador concentración media), hPDLC (células humanas del ligamento periodontal). **Fuente: elaboración propia.**