



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

TESIS

**“EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE UNA SOLUCIÓN
HIPEROSMÓTICA SOBRE BIOPELÍCULAS ODONTOLÓGICAS
MULTIESPECIE Y SU EFECTO CITOTÓXICO”**

PRESENTA

Mónica Elizabeth Rojas Briones

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

COTUTORA

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera

COTUTOR

Dr. Ricardo Oliva Rodríguez

ASESOR

Dr. Francisco Javier Avelar González

Aguascalientes, Ags, Junio 2020



M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio de la presente como Miembros del Comité Tutorial designados de la estudiante MÓNICA ELIZABETH ROJAS BRIONES con ID 232199 quien realizó la tesis titulada: "EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE UNA SOLUCIÓN HIPEROSMÓTICA SOBRE BIOPELÍCULAS ODONTOLÓGICAS MULTIESPECIE Y SU EFECTO CITOTÓXICO", un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 31 de julio de 2020.

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera
Coutora de Tesis

Dr. Ricardo Oliva Rodríguez
Cotutor de Tesis

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

Dr. Francisco Javier Avelar González
Asesor de Tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

**DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL
EXAMEN DE GRADO**



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 31/07/2020

NOMBRE: MÓNICA ELIZABETH ROJAS BRIONES **ID** 232199

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional **LGAC (del posgrado):** BIOINGENIERÍA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo práctico
EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE UNA SOLUCIÓN HIPEROSMÓTICA SOBRE BIOPELÍCULAS ODONTOLÓGICAS

TÍTULO: MULTIESPECIE Y SU EFECTO CITOTÓXICO

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): La solución hiperosmótica preparada sirve en el tratamiento edodóntico

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí SI

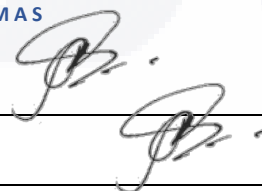
No _____

FIRMAS

Elaboró:

DRA. ALMA LILIÁN GUERRERO BARRERA. LGAC BIOINGENIERÍA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

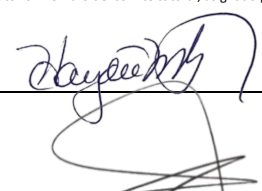
DRA. ALMA LILIÁN GUERRERO BARRERA. SECRETARIO TÉCNICO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

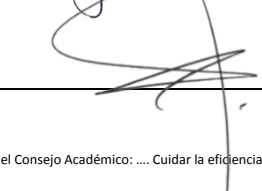
Revisó:

DRA. HAYDEE MARTÍNEZ RUVALCABA. SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:



Autorizó:

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ. DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

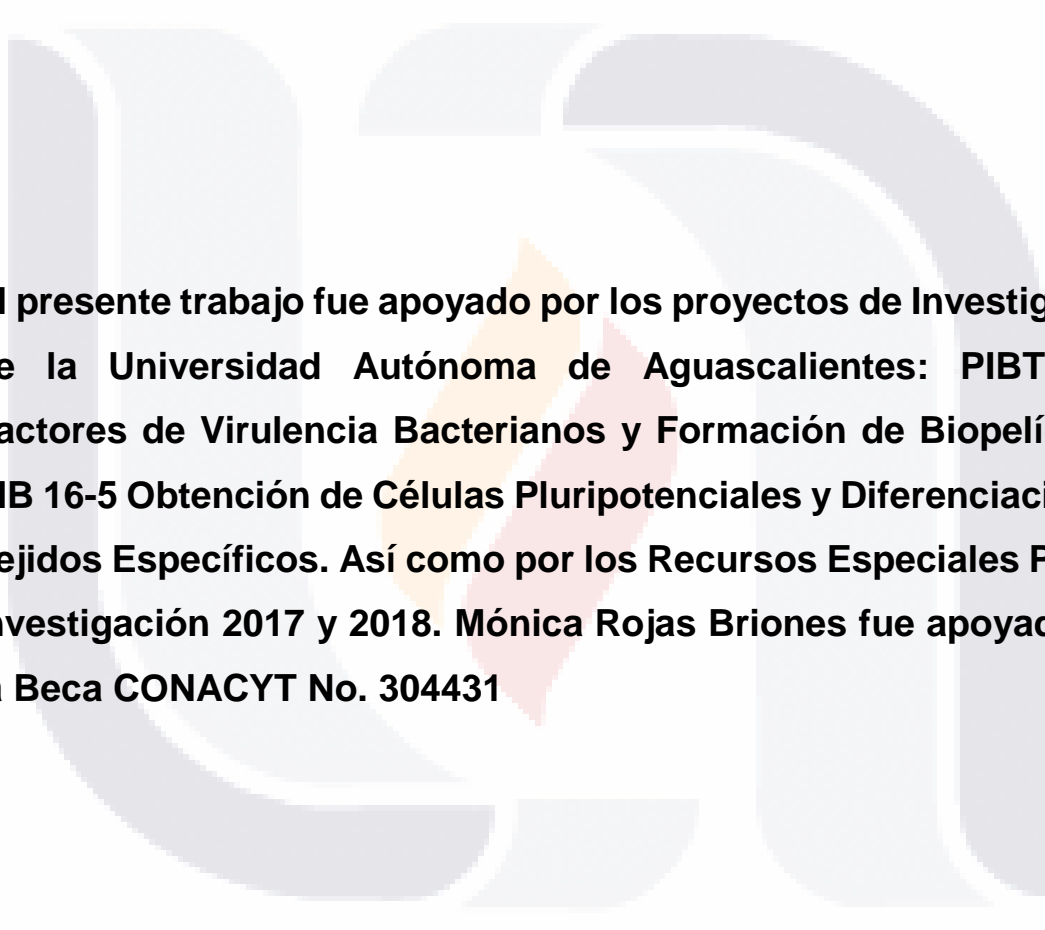


Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
 Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
 Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
 Actualización: 01
 Emisión: 20/06/19



El presente trabajo fue apoyado por los proyectos de Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes: PIBT 16-3 Factores de Virulencia Bacterianos y Formación de Biopelículas, PIB 16-5 Obtención de Células Pluripotenciales y Diferenciación en Tejidos Específicos. Así como por los Recursos Especiales Para la Investigación 2017 y 2018. Mónica Rojas Briones fue apoyada por la Beca CONACYT No. 304431

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por haberme otorgado el privilegio de haber formado parte de la institución.

Al Dr. Francisco Javier Avelar González y la Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera por compartir su conocimiento, experiencia y su valioso tiempo para que pudiera realizar y culminar mi trabajo.

Al Dr. Ricardo Oliva Rodríguez por su conocimiento y apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica desde licenciatura a la fecha.

Al personal del laboratorio de biología celular y tisular por compartir conmigo su experiencia.

Al personal del laboratorio del departamento de fisiología y biofísica de la facultad de Medicina de la UASLP.

A mi esposo por su apoyo y amor incondicional

A mis padres porque gracias a ellos he llegado hasta donde estoy el día de hoy <3

DEDICATORIAS

A mis padres y A mi esposo



INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVOS ESPECIFICOS	2
JUSTIFICACIÓN	3
HIPOTESIS 1	4
HIPÓTESIS 2	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.2 USO DE IRRIGANTES EN ENDODONCIA	9
2.3 SOLUCIÓN HIPEROSMÓTICA DE SORBATO DE POTASIO Y CLORURO DE SODIO	10
2.4 CITOTOXICIDAD CELULAR	12
2.5 ENSAYO DE VIABILIDAD MTT	13
2.6 CULTIVO CELULAR	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 ENSAYO EN PLACA DE MICROTITULACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BIOPELICULA ...	15
3.2 CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULA DE <i>Candida albicans</i>, <i>Enterococcus faecalis</i> Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES EN LAMINILLAS DE VIDRIO	18
3.3 ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN PRE Y POST TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULA DE <i>Candida albicans</i>, <i>Enterococco faecalis</i> Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES POR MICROSCOPÍA CONFOCAL	19
3.4 ENSAYO EN LAMINILLAS DE BIOPELÍCULA DE <i>Candida albicans</i>, <i>Enterococcus faecalis</i> Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES PARA CONTEO DE UFC	20
3.5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD SOBRE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO	21
3.6 IDENTIFICACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA, EMPLEANDO UN ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECÍFICO.	21
3.7 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD MTT	23
4. RESULTADOS	25
4.1 ENSAYO EN PLACA DE MICROTITULACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BIOPELICULA ...	25
4.2 CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULA DE <i>Candida albicans</i>, <i>Enterococcus faecalis</i> Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES EN LAMINILLAS DE VIDRIO	28

4.3 ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN PRE Y POST TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULA DE *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES POR MICROSCOPIA CONFOCAL..... 31

4.4 ENSAYO EN LAMINILLAS DE BIOPELÍCULA DE *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES PARA CONTEO DE UFC..... 34

4.5 CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO 35

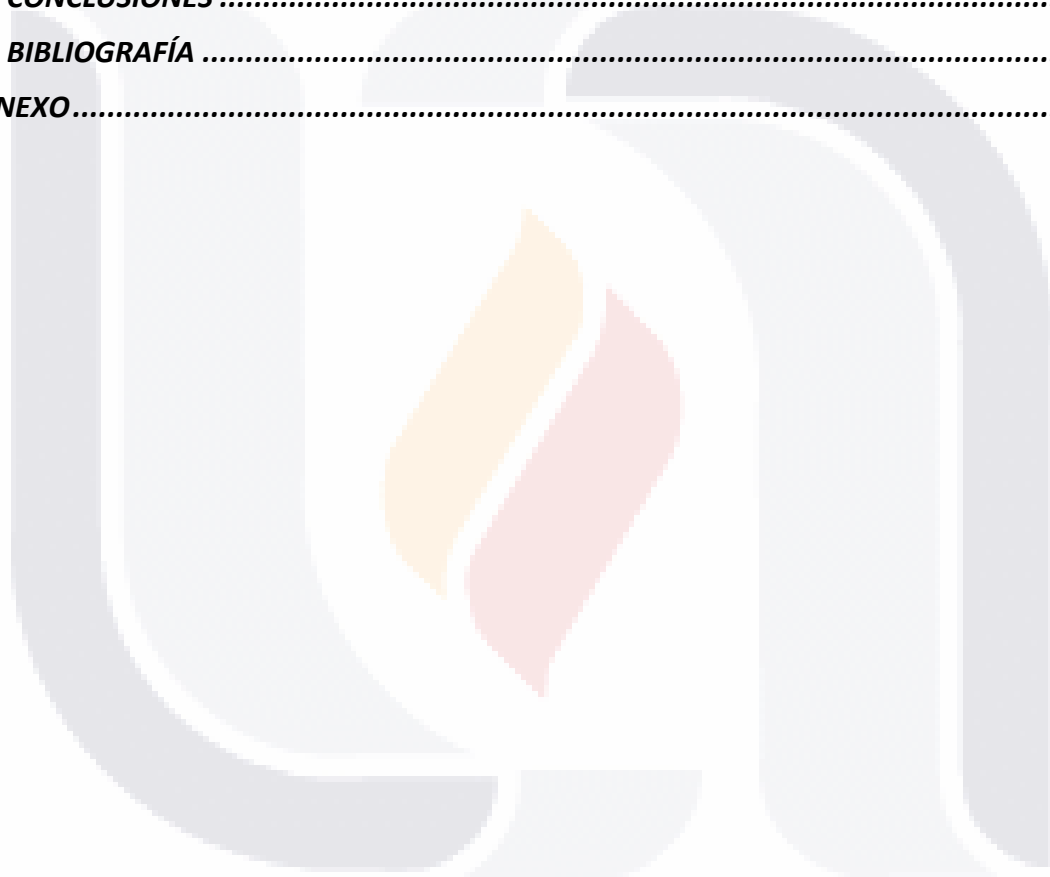
4.6 ENSAYO MTT..... 36

5. DISCUSIÓN37

6. CONCLUSIONES40

7. BIBLIOGRAFÍA41

ANEXO.....46



INDICE DE GRÁFICAS Y TABLAS

<i>Gráfica 1. Crecimiento de la biopelícula de Candida albicans cuantificada a través de densidad óptica. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica. Los valores con significancia están marcados con (*).</i>	26
<i>Gráfica 2. Crecimiento de la biopelícula de Enterococcus faecalis cuantificada a través de densidad óptica. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica. Los valores con significancia están marcados con (*).</i>	27
<i>Gráfica 3. Crecimiento de la biopelícula de Enterococcus faecalis y Candida albicans cuantificada a través de densidad óptica. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica. Los valores con significancia están marcados con (*).</i>	28
<i>Gráfica 4. Crecimiento de la biopelícula de Candida albicans. La biopelícula fue cuantificada a través de microscopía confocal con el sistema Image J. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica</i>	32
<i>Gráfica 5. Crecimiento de la biopelícula de Enterococcus faecalis. La biopelícula fue cuantificada a través de microscopía confocal con el sistema Image J. En ambas gráficas se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica.</i>	32
<i>Gráfica 6. Crecimiento de la biopelícula mixta de Enterococcus faecalis con Candida albicans. La biopelícula fue cuantificada a través de microscopía confocal con el sistema Image J. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica</i>	33
<i>Tabla 1. Muestra el número de UFCs comparando el grupo control con el grupo tratado con la solución hiperosmótica</i>	34
<i>Gráfica 7. Muestra el porcentaje de viabilidad celular obtenida del ensayo MTT</i>	36

INDICE DE FIGURAS

<i>Fig. 1 Etapas o fases de la formación de biopelícula. (Tomado de Kishen & Haapasalo, 2012).</i>	7
<i>Fig. 2 Siembra de Enterococcus faecalis de 24 hrs de crecimiento sobre agar BHI</i>	15
<i>Fig. 3 Siembra de Candida albicans de 48 hrs de crecimiento sobre agar Dextrosa Sabouraud</i>	15
<i>Fig. 5 Caja de 96 pozos inoculada</i>	17
<i>Fig. 4 Configuración de la caja de 96 pozos con acuerdo a la distribución de las muestras</i>	17
<i>Fig. 6 Biopelículas en contacto con las soluciones (solución hiperosmótica, NaOCl 5.25% y Agua destilada estéril)</i>	20
<i>Fig. 7 Confluencia de los fibroblastos en cultivo mayor al 80%. Aumento Total: 100.</i>	22
<i>Fig. 8 Biopelícula de E. faecalis de 48 h de maduración, marcada con Film Tracer, tomada en tercera dimensión para mostrar el grosor alcanzado por la biopelícula.</i>	29
<i>Fig. 9 Biopelícula de E. faecalis de 72 h de maduración, marcada con Film Tracer, tomada en tercera dimensión para mostrar el grosor alcanzado por la biopelícula.</i>	29
<i>Fig. 10 Biopelícula de C. albicans de 48 h de maduración, marcada con Sypro Ruby BMS, tomada en tercera dimensión para mostrar el grosor alcanzado por la biopelícula.</i>	29
<i>Fig. 11 Biopelícula de C. albicans de 72 h de maduración, marcada con Sypro Ruby BMS, tomada en tercera dimensión para mostrar el grosor alcanzado por la biopelícula.</i>	30
<i>Fig. 12 Biopelícula de E. faecalis y C. albicans de 48 h de maduración, marcada con Film Tracer, tomada en tercera dimensión para mostrar la estructura y conformación tridimensional de la biopelícula.</i>	30
<i>Fig. 13 Biopelícula de E. faecalis y C. albicans de 72 h de maduración, marcada con Film Tracer, tomada en tercera dimensión para mostrar la estructura y conformación tridimensional de la biopelícula.</i>	31
<i>Fig. 14 Imágenes observadas en microscopio de fluorescencia a un aumento de 60X, observándose la positividad del anticuerpo, así como la morfología propia del fibroblasto.</i>	35

“EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE UNA SOLUCIÓN HIPEROSMÓTICA SOBRE BIOPELÍCULAS ODONTOLÓGICAS MULTIESPECIE Y SU EFECTO CITOTÓXICO”

M.E MÓNICA ELIZABETH ROJAS BRIONES

Doctorado en Ciencias Biológicas
Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Morfología
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Aguascalientes, México

Junio 2020

Resumen

La cavidad oral es un ambiente rico en biopelículas microbianas, que representan un problema en el tratamiento endodóntico, durante el cual para preservar su esterilidad se usan soluciones de hipoclorito de sodio. El presente trabajo tuvo como objetivo el uso de una solución alternativa hiperosmótica preparada con sorbato de potasio, cloruro de sodio, etanol, agua y ácido clorhídrico para mejorar su actividad antimicrobiana y disminuir su toxicidad. Así, se evaluó el efecto antimicrobiano de esta solución sobre biopelículas microbianas multiespecie y la toxicidad ejercida sobre el modelo celular de cultivo de fibroblastos de ligamento periodontal humano. Esta solución se probó sobre biopelículas mono-especie de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* y en biopelículas mixtas de ambos microorganismos. Las biopelículas empleadas se formaron durante 24, 48 y 72 h en cajas de 96 pozos, y el tratamiento con la solución fue por 15 minutos, posteriormente las biopelículas fueron contrastadas con cristal violeta. La evaluación del efecto de la solución se realizó también sobre biopelículas crecidas en portaobjetos durante 48 y 72 horas, con el fin de obtener UFC y observar al microscopio confocal. En todos los casos como control positivo se usó hipoclorito de sodio al 5.25% (NaOCl) y como control negativo agua destilada estéril.

Los experimentos en cajas de 96 pozos mostraron disminución significativa en las biopelículas de *C. albicans*, *E. faecalis* y biopelículas mixtas de 24 y 48 h. La biopelícula mixta de 72 h presentó disminución, pero no significativa. No hubo crecimiento de UFC cuando se trató con la solución hiperosmótica, lo cual fue corroborado por Microscopía confocal. Tampoco hubo diferencia significativa en la reducción de biopelícula en ambos tiempos de maduración y en los 3 tipos de biopelícula.

Para la prueba de citotoxicidad se cultivaron fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano hasta 80% de confluencia, y se realizó tratamiento con la solución hiperosmótica durante 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min, la viabilidad se determinó mediante un ensayo de MTT. Para lo anterior se formaron 4 grupos experimentales uno tratado con NaOCl al 5.25%, otro tratado con NaOCl al 2.5%, un grupo tratado con la solución hiperosmótica y otro tratado con PBS como grupo control negativo. Los resultados obtenidos mediante el ensayo de MTT mostraron que la solución hiperosmótica no es citotóxica. Por lo anterior la presente tesis muestra que la solución hiperosmótica presenta efecto antibacteriano sobre biopelículas microbianas y no es citotóxica para los fibroblastos en cultivo.

Palabras clave: *C. albicans*, *E. Faecalis*, Solución hiperosmótica, citotoxicidad

Summary

The oral cavity is an environment rich in microbial biofilms, which represent a problem in endodontic treatment, during which sodium hypochlorite solutions are used to preserve its sterility. The present work aimed to use a hyperosmotic alternative solution prepared with potassium sorbate, sodium chloride, ethanol, water and hydrochloric acid to improve its antimicrobial activity and decrease its toxicity. Thus, the antimicrobial effect of this solution on multispecies microbial biofilms and the toxicity exerted on the cell model of human periodontal ligament fibroblast culture were evaluated. This solution was tested on monospecies biofilms of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* and on mixed biofilms of both microorganisms. The biofilms used were formed during 24, 48 and 72 h in 96 wells plates, and the treatment with the solution was for 15 minutes, later the biofilms were contrasted with crystal violet. The evaluation of the effect of the solution was also carried out on biofilms grown on slides for 48 and 72 hours, in order to obtain CFU and observe under the confocal microscope. In all cases, 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl) was used as a positive control and sterile distilled water was used as a negative control. Experiments in 96-well plates showed significant decrease in biofilms of *C. albicans*, *E. faecalis* and mixed biofilms of 24 and 48 h. The 72 h mixed biofilm showed a decrease, but not significant. There was no CFU growth when treated with the hyperosmotic solution, which was corroborated by confocal microscopy. There was also no significant difference in biofilm reduction at both biofilms maturation times and in the 3 types of biofilm. For the cytotoxicity test, fibroblasts derived from human periodontal ligament were cultured up to 80% confluence, and treatment with the hyperosmotic solution was performed for 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min, the viability was determined by means of an MTT test. For this, 4 experimental groups were formed, one treated with NaOCl 5.25%, another treated with NaOCl 2.5%, one group treated with the hyperosmotic solution and another treated with PBS as a negative control group. The results obtained by the MTT test showed that the hyperosmotic solution is not cytotoxic. Therefore, the present thesis shows that the hyperosmotic solution has an antibacterial effect on microbial biofilms and is not cytotoxic for fibroblasts in culture.

1. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral es un ambiente rico en biopelículas microbianas, que representan un problema en el tratamiento endodóntico, durante el cual para preservar su esterilidad se usan soluciones de hipoclorito de sodio. La evaluación de los materiales dentales utilizados en humanos tiene que pasar varias pruebas antes de ser autorizada, en el presente estudio se analizó la capacidad antimicrobiana de una solución hiperosmótica elaborada con sales de sorbato de potasio y cloruro de sodio que provoca el choque hiperosmótico en microorganismos potencialmente patógenos. Para lo anterior se realizaron ensayos sobre biopelículas realizadas *in vitro* con microorganismos como de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, así como pruebas de citotoxicidad sobre fibroblastos de ligamento periodontal empleando la solución hiperosmótica de sales de sorbato de potasio y el cloruro de sodio, que actúan sinérgicamente para la eliminación de los microorganismos provocando un choque hiperosmótico que provoca la pérdida de agua y provoca la muerte celular de los patógenos elegidos para la formación de la biopelícula. Así se logra el efecto antimicrobiano que es de gran importancia para la endodoncia, pues uno de los objetivos del tratamiento endodóntico es eliminar las bacterias y sus productos alojados dentro del conducto radicular infectado. Lo anterior se logra con la irrigación de la solución hiperosmótica, cuya función es eliminar bacterias, barrillo dentinario, realizar un efecto de enjuague sin producir daño al paciente, en caso de que esta solución llegara a salir del periápice, por lo tanto, también es importante que la solución irrigante tenga un efecto antibacteriano pero carezca de citotoxicidad para que no provoque ninguna reacción adversa sobre los tejidos adyacentes al órgano dentario. Por lo anterior se realizó la evaluación de citotoxicidad de la solución hiperosmótica en un modelo celular de fibroblastos obtenidos de ligamento periodontal en cultivo celular, pues estas células forman parte del tejido que es afectado en una intervención endodóntica. De esta forma, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antibacteriano de la solución hiperosmótica de sales de sorbato de potasio y el cloruro de sodio, sobre biopelículas de *Enterococcus faecalis*, de *Cándida albicans*, así como de una

biopelícula multiespecie formadas por ambos microorganismos y determinar la toxicidad de esta solución sobre fibroblastos obtenidos de ligamento periodontal en cultivo celular.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Posee la solución hiperosmótica capacidad antibacteriana contra biopelículas formadas por *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, es biocompatible con los tejidos orales humanos y no presenta efecto citotóxico?

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antibacteriano de una solución hiperosmótica de sales de sorbato de potasio y cloruro de sodio sobre biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* y determinar la citotoxicidad de la solución sobre fibroblastos de ligamento periodontal en cultivo celular.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Formar una biopelículas independientes de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Posteriormente formar una biopelícula mixta con ambas especies.
2. Evaluar el efecto de la solución hiperosmótica de sales de sorbato de potasio y de cloruro de sodio sobre las biopelículas formadas a través de la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC's) y la cuantificación de la densidad óptica

Realizar pruebas de citotoxicidad de la solución hiperosmótica de sales de sorbato de potasio y de cloruro de sodio sobre fibroblastos de ligamento periodontal en cultivo celular.

JUSTIFICACIÓN

La irrigación juega una función muy importante en el tratamiento endodóntico pues durante y después de la instrumentación el irrigante facilita la remoción de remanentes de tejido, chips dentinarios y microorganismos presentes dentro del conducto radicular por medio de un mecanismo de enjuague en el interior del conducto (Haapasalo, Shen, Qian, & Gao, 2010). Las soluciones utilizadas como irrigantes en endodoncia tienen ciertas características como: efecto antibacteriano, disolución de tejido orgánico e inorgánico, sin embargo, algunas poseen potencial citotóxico pudiendo causar dolor severo si ésta llegara a tener contacto con los tejidos periapicales. Ninguna de las soluciones irrigantes disponibles es considerada óptima pues no existe alguna que evite la mayor parte de los efectos negativos cuando se realiza este procedimiento en el paciente. La irrigación tradicional ha demostrado ciertas desventajas para lograr la desinfección del sistema de conductos pues actualmente no existe un producto, técnica o aparato que cumpla con los criterios ideales para la eliminación bacteriana (Basrani y Haapasalo, 2012).

Debido a lo anterior se propone una nueva alternativa, que consiste en una mezcla de sales que son utilizadas para prevenir el desarrollo bacteriano en alimentos, esta combinación altera la osmolaridad, provoca un estrés hiperosmótico dentro de la célula bacteriana, reduce la cantidad de agua disponible en su citoplasma, proceso conocido como plasmólisis, e inhibe una variedad de procesos fisiológicos, que van desde el consumo de nutrientes hasta la replicación del ADN, logra por consiguiente la muerte bacteriana (Alfieri & Petronini, 2007). Esta solución, sin embargo debe evaluarse en cuanto a su efecto antimicrobiano, así como el efecto citotóxico que ejerza sobre los tejidos en los que será empleada.

HIPOTESIS 1

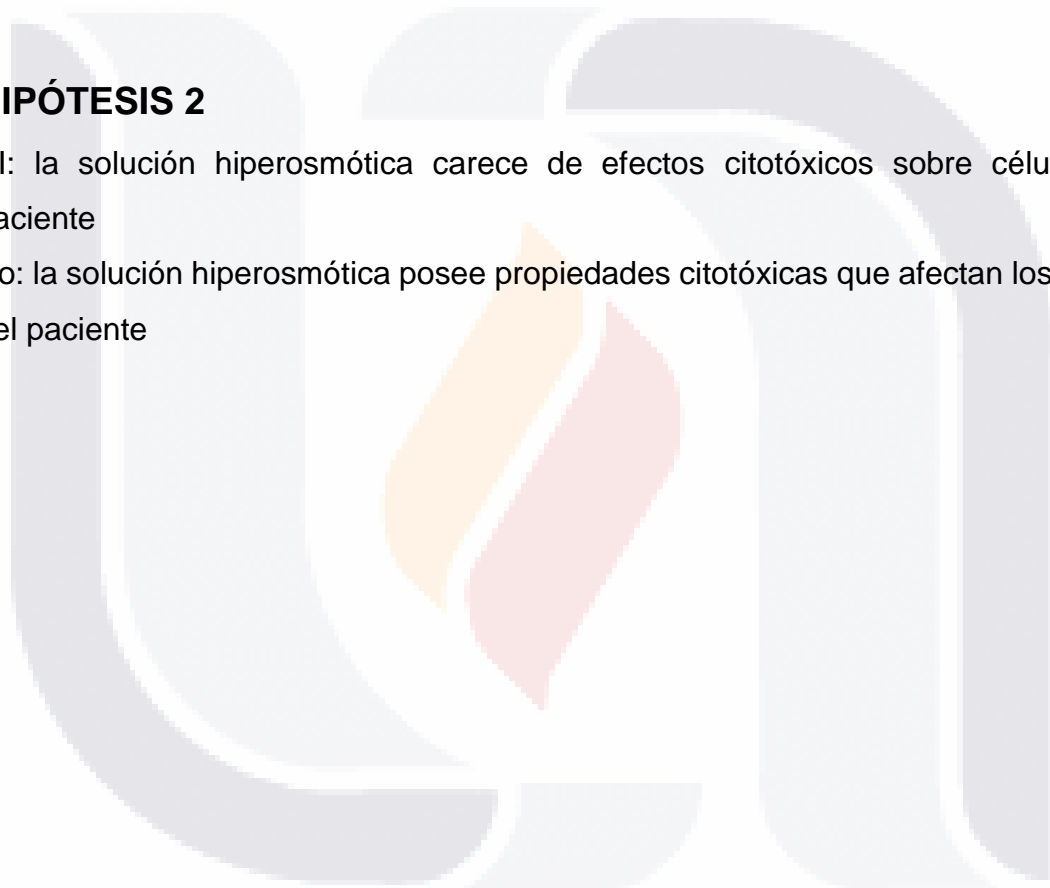
HI: la solución hiperosmótica posee capacidad antibacteriana sobre biopelículas microbianas

Ho: La solución hiperosmótica no posee capacidad antibacteriana sobre biopelículas microbianas

HIPÓTESIS 2

HI: la solución hiperosmótica carece de efectos citotóxicos sobre células del paciente

Ho: la solución hiperosmótica posee propiedades citotóxicas que afectan los tejidos del paciente



2. MARCO TEÓRICO

El tratamiento endodóntico es un procedimiento utilizado para eliminar la patología presente dentro del complejo dentino-pulpar y el área periodontal. Este procedimiento endodóntico consta principalmente de 3 fases: preparación mecánica (por medio de instrumentos manuales y/o rotatorios), desinfección química (por medio de soluciones irrigantes) y obturación tridimensional (Park, Shen, & Haapasalo, 2013).

El éxito del tratamiento endodóntico no solo es dependiente de la eliminación bacteriana del sistema de conductos, por medio de la preparación mecánica y la desinfección química, si no, también de la prevención de la re-infección del espacio del conducto radicular (Chan, 2015).

En el área endodóntica el principal agente etiológico son las bacterias y sus productos metabólicos, los cuales son responsables de provocar diversas patologías dentro del sistema de conductos (Haapasalo et al., 2010). La flora bacteriana del conducto radicular infectado varía según la patología presente, en el caso de la periodontitis apical post-tratamiento, una de las especies prevalentes son los cocos gram positivos como el *Enterococcus faecalis* (C. Sedgley, Nagel, Dahlén, & Reit, 2006) que es un coco anaerobio facultativo y que presenta diversos factores de virulencia, soporta tiempos de ayuno, se une a la dentina e invade tubulillos dentinarios, altera la respuesta del huésped, suprime la acción de los linfocitos, posee enzimas líticas como la citolisina y los ácidos lipoteicoicos, utiliza el suero como fuente de nutrición, resiste la medicación intraconducto, compite con otras células y forma biopelículas (Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006). Además, se ha demostrado que *E. faecalis* tiene la capacidad de entrar y recuperarse de un estado viable no cultivable, estrategia de sobrevivencia que adopta cuando es expuesto al estrés ambiental (C. M. Sedgley, Lennan, & Appelbe, 2005).

Candida albicans es otro microorganismo encontrado en el conducto radicular infectado, pertenece a la microbiota normal del ser humano, coloniza asintóticamente diversas partes del cuerpo, como la cavidad oral. En la mayoría

de los individuos *C. albicans* permanece en armonía con otros miembros de la microbiota, sin embargo, cuando hay un desbalance fisiológico, puede proliferar y provocar una infección (Gulati, Nobile, & Biology, 2017).

Los hongos se como *C. albicans* se presentan en infecciones resistentes al tratamiento de endodoncia y son parcialmente responsables del fracaso del tratamiento en lesiones periapicales a pesar de la limpieza e irrigación del conducto radicular, incluso *Candida albicans* se ha aislado de conductos radiculares con y sin lesión periapical (Ahangari, Bidabadi, Asnaashari, Rahmati, & Tabatabaei, 2017).

Candida albicans y *Enterococcus faecalis* sobreviven en monoinfecciones e incluso tienen la capacidad de invadir túbulos dentinarios (Knezovic & Ivanis, 2017). Ambos microorganismos poseen la capacidad de formar biopelículas y pueden vivir en comensalismo.

2.1 BIOPELÍCULAS MICROBIANAS

Las biopelículas representan una estrategia bacteriana de crecimiento que les permite formar comunidades tridimensionales con canales a través de los cuales eliminan productos de desecho, transportan nutrientes y eliminan sustancias que se utilizan para eliminarlas (Loera-Muro [a] et al., 2012). Estas estructuras se rodean y sumergen dentro de una matriz extracelular de polímeros extracelulares producida por las bacterias que la conforman (Loera-Muro [b] et al., 2012), es una forma de crecimiento microbiano donde las comunidades dinámicas de las células sésiles están irreversiblemente unidas a un sustrato sólido así como entre ellas y que representa una estrategia de sobrevivencia y resistencia para estas comunidades microbianas (Costerton, et al., 2011, Jhajharia et al., 2015, Loera-Muro et a., [a], 2012).

La formación de una biopelícula se divide en etapas o fases (Figura 1), la fase inicial, fase 1 o de adherencia bacteriana, es reversible y determinada por las propiedades físicas o químicas de la interacción bacteria-sustrato, esta fase es mediada por las estructuras superficiales de la bacteria como: fimbrias, pilli, flagelos y exopolisacáridos. La fase 2 o fase de adherencia microbiana, no específica del sustrato, se caracteriza por la formación de puentes entre la bacteria y la película

condicionadora los cuales son una combinación de atracción electrostática y uniones covalente/hidrogeno, con el tiempo estos hacen que esta fase sea irreversible, en el estadio final una adhesión bacteriana más específica al sustrato es establecida a través de adhesinas polisacáridas o formación de ligandos. En la fase 3 o fase de adherencia microbiana específica del sustrato, las moléculas de adhesina o ligandos en la superficie de la célula bacteriana se unirán a los receptores en el sustrato, en esta fase la adhesión bacteriana a la superficie es menos afectada por factores ambientales.

Estos son procesos que ocurren en función de tiempo, las fases reversible e irreversible en la fase 1 suceden en pocos segundos a minutos, mientras que la fase 2 y 3 suceden en pocas horas a días dependiendo de la bacteria y las condiciones ambientales.

Durante el desarrollo de la biopelícula las células bacterianas residentes proliferan, permitiendo la expansión de la estructura de la biopelícula, en este estadio la monocapa de colonizadores primarios atraen colonizadores secundarios formando micro colonias lo cual resulta en la estructura final de la biopelícula (Kishen & Haapasalo, 2012) .

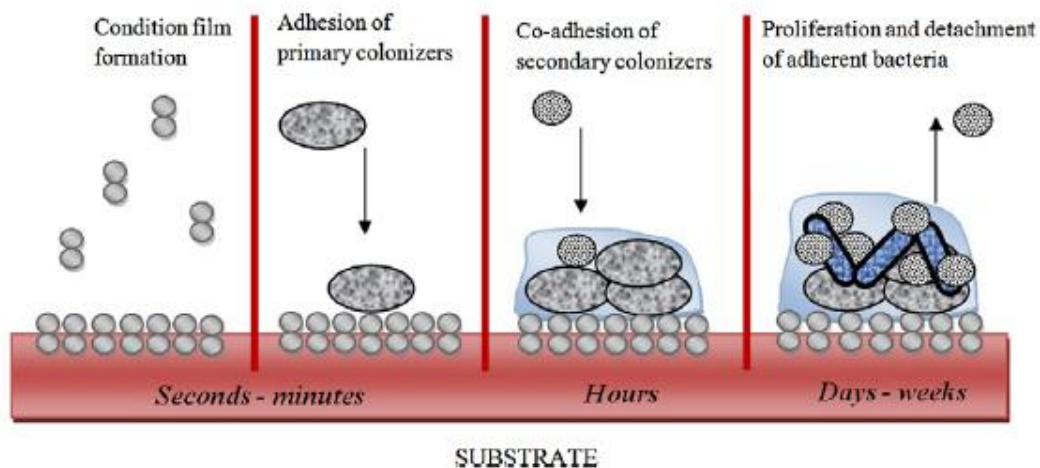


Fig. 1 Etapas o fases de la formación de biopelícula. (Tomado de Kishen & Haapasalo, 2012).

Al realizar un modelo de estudio de formación de biopelícula es importante tener en cuenta las condiciones ambientales y de sustrato que sean necesarias para que las fases de formación de biopelícula ocurran adecuadamente, existen numerosas formas de formar biopelículas las cuales dependen del tipo de estudio que se quiera realizar e incluso en el área que será aplicada.

La cavidad oral representa un ecosistema complejo con una diversidad microbiológica abundante debido a la gran cantidad de superficies que la conforman (Cruz Quintana et al., 2017). En el presente trabajo, se emplearon *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* como microorganismos modelo asociados al ambiente endodóntico.

Para estudiar las biopelículas en la presente tesis se usaron dos sistemas experimentales, uno utilizando cajas de 96 pozos para cultivo celular, introducido en 1980 y mediante el cual se evalúa la actividad de los microorganismos para adherirse a la superficie plástica de una placa de microtitulación bajo una temperatura y condiciones determinadas por el experimentador, método descrito por primera vez en 1996 por Genevaux et al (Genevaux, Muller, & Bauda, 1996). El cual permite estudiar varias muestras en un solo ensayo, así como las etapas tempranas de formación de la biopelícula, la biomasa, la viabilidad celular, las dimensiones y la distribución de la biopelícula (Filloux y Walker, 2014; Shukla y Rao, 2017; Peeters y Coenye, 2008). Además de este ensayo en cajas de 96 pozos también se empleó el método de formación de biopelículas estático sumergido en un medio específico, empleado para realizar ensayos in vitro para diferentes evaluar la adherencia de especies bacterianas específicas a cualquier superficie de un biomaterial, evaluar la naturaleza de la formación de biopelícula temprana en un sustrato particular, evaluar la interacción entre diferentes biopelículas bacterianas y las células inmunes del huésped, así como evaluar la eficacia de agentes antimicrobianos o estrategias de tratamientos antimicrobianos (Kishen & Haapasalo, 2012).

2.2 USO DE IRRIGANTES EN ENDODONCIA

Para asegurar la completa eliminación bacteriana dentro del sistema de conductos se requiere un efectivo agente antimicrobiano, que ayude a disolver, remover tejido y biopelículas existentes en las áreas inaccesibles en las cuales la instrumentación biomecánica no puede alcanzar, actualmente en endodoncia el agente antimicrobiano más utilizado es el hipoclorito de sodio, utilizado en concentraciones que van desde 0.5% al 6%, estudios in vitro han demostrado que a mayor concentración, mayor efectividad contra *E. faecalis* y *Candida albicans*, además que posee mejor disolución de tejido, el cual a su vez a mayor concentración es igual a mayor toxicidad (Basrani & Haapasalo, 2012). El uso de irrigantes en endodoncia, se debe confinar al sistema de conductos, lo cual no siempre es posible ya que durante el procedimiento los irrigantes pueden extruirse, sobre todo en casos de ápices abiertos, de sobre instrumentación, perforaciones y en caso de resorción externa. Lo cual provoca destrucción de tejido, necrosis, edema o dolor severo (Zhua Wan-chun, Gyamfi Jaqueline, Niu Li-na, Schoeffel John, Liu Si-ying, Santarcangelo Filippo, Khan Sara, Tay Kelvin, Pashley David, 2013).

El pH y la concentración del ion hidróxido del hipoclorito de sodio varía significativamente de acuerdo a la marca del producto, en un rango de 10.9 a 12 para el pH y de 0.03-1.1% para la concentración del ion hidróxido (Wright, Kahler, & Walsh, 2017), una de las ventajas de utilizar hipoclorito de sodio como irrigante endodóntico es que tiene la capacidad de disolver la materia orgánica, las maneras de aumentar la disolución de tejido por el hipoclorito de sodio son: aumento del pH, concentración y temperatura de la solución, además de la agitación ultrasónica y el tiempo prolongado de trabajo (Tartari et al., 2016), por lo tanto contribuye a lograr la efectiva limpieza del conducto radicular disolviendo el tejido pulpar remanente; aunque uno de los problemas del uso del hipoclorito de sodio es el efecto que este provoca al tejido dentinario, cambiando su composición química ya que las moléculas de hipoclorito de sodio pueden penetrar en la matriz colágena encapsulada en apatita debido a su bajo peso molecular provocando la oxidación de la materia orgánica, desnaturalización de colágeno y efectos adversos en las

propiedades mecánicas de la dentina, incluso se ve afectada la capacidad de sellado y la adhesión de cementos a base de resina, así como selladores que químicamente se adhieren al colágeno dentinario (Tartari et al., 2016). Poniendo en riesgo el sellado de la restauración posterior y debilitando las paredes dentinarias predisponiendo el órgano dentario a una fractura.

2.3 SOLUCIÓN HIPEROSMÓTICA DE SORBATO DE POTASIO Y CLORURO DE SODIO

El equilibrio de la osmolaridad es uno de los parámetros fisiológicos mas controlados pues es un balance en las concentraciones de un solvente y un soluto, el estrés osmótico es un potente regulador de la función normal de las células que están expuestas a ambientes osmóticamente activos bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Finan & Guilak, 2010).

El estrés osmótico puede deberse a un choque hiperosmótico, dado por un aumento en la osmolaridad externa al microorganismo invasor, o bien por un choque hipo-osmótico. El choque hiperosmótico produce una pérdida de agua, contracción celular, aumenta la fuerza iónica intracelular y acumulación macromolecular. Se ha observado que algunas concentraciones de iones inorgánicos como sodio, potasio y cloro desestabilizan la estructura secundaria de las proteínas e interrumpen la actividad enzimática (Choe & Strange, 2008). Si el estrés osmótico continúa provocará una plasmólisis celular como consecuencia directa de la penetración de solutos en la membrana externa, membrana interna o membrana celular, dependiendo del microorganismo involucrado, y el equilibrio con el ambiente externo. Iones como el cloruro de sodio penetran la membrana externa inmediatamente, provocando la plasmólisis segundos después del shock (Pilizota & Shaevitz, 2013).

La solución hiperosmótica es una solución que actúa por hiperosmolaridad, el estrés metabólico hiperosmótico inhibe el crecimiento y elimina microorganismos, reduciendo la cantidad de agua disponible en el citoplasma (Van der Waal et al., 2011; Van der Waal et al., 2012). provocando la muerte celular. Los componentes principales de la solución hiperosmótica son el sorbato de potasio y el cloruro de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sodio, los cuales son considerados como seguros por la FDA, la combinación de ambos provoca una sinergia para la eliminación de microorganismos, éstos al ser combinados en una solución actúan por una estrategia múltiple, combinando el estrés hiperosmótico, el estrés por medio del ácido débil y las propiedades antimicrobianas del ácido sórbico (Van der Waal, Scheres, de Soet, Wesselink, & Crielaard, 2014).

La acción antimicrobiana del sorbato, se basa en la inhibición de enzimas metabólicas involucradas con el metabolismo de los carbohidratos (fumarasa y aspartasa); el ácido sórbico se une covalentemente con los grupos sulfhidrilo de las enzimas e inactiva esta parte de la enzima. Los preservadores como los ácidos débiles pueden incluso afectar el rendimiento celular, los niveles de ATP y la capacidad celular para mantener la homeostasis del pH, alterando el transporte del sustrato y la fosforilación oxidativa (Beales, 2004).

El cloruro de sodio se ha utilizado ampliamente en la industria alimenticia para preservar alimentos, pues disminuye la actividad del agua y junto con la temperatura y el pH alteran el crecimiento bacteriano y su sobrevivencia, el efecto letal de la disminución del agua intracelular, está basado en el hecho de que el turgor en una célula es el resultado de la homeostasis del agua intracelular y el agua en el medio circundante, por lo tanto al disminuir el agua intracelular se realiza un proceso llamado plasmólisis el cual describe como el shock hiperosmótico provoca la salida instantánea del agua, acompañada de una disminución en el volumen citoplasmico (Wijnker, Koop, & Lipman, 2006).

El cloruro de sodio y el sorbato de potasio, son utilizados como preservadores en la industria alimenticia, por lo tanto, se proponen como agentes antibacterianos en el área endodóntica esperando que al ser utilizados no tengan un efecto citotóxico al estar en contacto con los tejidos circundantes.

2.4 CITOTOXICIDAD CELULAR

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado.

Los estudios in vitro son ampliamente utilizados en la biología celular en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo, dentro de la batería de ensayos in vitro, necesarios para realizar ensayos clínicos de cierta sustancia o material se encuentran los ensayos de citotoxicidad, los cuales tienen la capacidad de detectar a través de diferentes mecanismos celulares los efectos adversos y/o propiedades esenciales para la proliferación, función o supervivencia celular, las cuales incluyen la integridad de la membrana celular, división, degradación, síntesis y metabolismo; así como liberación de productos o constituyentes celulares (Arencibia Arrebola, Rosario Fernandez, & Curveco Sanchez, 2003).

Los materiales dentales que son utilizados en humanos deben ser evaluados en cuanto a su biocompatibilidad antes de optimizar su rendimiento clínico.

Los materiales dentales deben adaptarse a la cavidad oral humana, por lo tanto, las líneas celulares humanas derivadas de tejidos orales normales son las apropiadas para realizar pruebas de citotoxicidad de los materiales que serán utilizados en la cavidad oral.

La literatura ha mostrado el éxito del uso de células primarias humanas como fibroblastos gingivales, fibroblastos de ligamento periodontal y fibroblastos pulpares para el estudio de análisis citotóxicos en el campo de la investigación en materiales dentales (Illperuma et al., 2011).

La evaluación de la citotoxicidad es la parte inicial de la evaluación de la biocompatibilidad, el tipo celular más utilizado para evaluar citotoxicidad son los fibroblastos, los cuales son subpoblaciones celulares en forma de huso y distribuidas ampliamente a nivel de los tejidos del cuerpo. Su origen es mesenquimático y se consideran el componente principal del tejido conectivo, tiene alto potencial en regeneración tisular (Padrón et al., 2012). En el área de la investigación odontológica, se utilizan los fibroblastos provenientes de tejido gingival, con el fin de replicar el efecto a evaluar de la manera más fisiológica

posible, obteniendo muestras de pacientes y posteriormente en un ambiente controlado obtener el cultivo celular para poder realizar posteriormente las pruebas debidas.

2.5 ENSAYO DE VIABILIDAD MTT

El ensayo de viabilidad comúnmente empleado para cultivos celulares es el realizado con sal de tetrazolio o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- bromuro de difeniltetrazolio), introducido por Mosmann para medir la proliferación y citotoxicidad en caja de 96 pozos, debido a sus grupos lipofílicos y carga neta positiva, el MTT tiene la capacidad de pasar la membrana celular y se reduce en células viables por enzimas mitocondriales o plasma celular como deshidrogenasas, oxidorreductasas, oxidasas y peroxidasas utilizando NADPH, NADH, succinato o piruvato como electrón donante, dando como resultado una conversión de MTT a formazán insoluble en agua (Präbst, Engelhardt, Ringgeler, & Hübner, 2017).

La gran ventaja de este ensayo celular es que dicha reacción solo sucede en células vivas con una mitocondria funcional, por lo tanto se asume que la cantidad de formazán formada durante el tiempo de exposición es directamente proporcional al número de células viables por pozo, por lo tanto el ensayo de MTT es un ensayo conveniente, confiable y cuantitativo para medir proliferación celular y viabilidad.

La cantidad de estos cristales de formazán puede ser medida por medio de espectrofotometría en longitudes de onda que van desde 500-600nm.

2.6 CULTIVO CELULAR

En 1882, Sydney Ringer desarrolló la solución de Ringer, una solución salina balanceada de una composición que es muy parecida a los fluidos fisiológicos del cuerpo humano, las soluciones salinas balanceadas fueron desarrolladas una después de otra a partir del reporte de Ringer, incluyendo la solución de Locke, la solución Tyroides y la solución de bicarbonato de Krebs-Ringer; la solución de el cultivo celular es fundamental para la investigación sobre todo en los ensayos del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

área biomédica y la investigación pre-clínica, además permite el estudio del metabolismo y fisiología humana lo cual no es posible estudiarlo in vivo.

En el cultivo celular normalmente se utilizan células tomadas del tejido original, el tejido tomado es tratado por diversas metodologías las cuales pueden ser: digestión enzimática, mecánica o disociación química; El cultivo celular es llevado a cabo en un laboratorio con estricta esterilidad y un ambiente controlado el cual involucra temperatura, gases y presión; tratando de imitar el ambiente in vivo para permitir la sobrevivencia y proliferación de una manera controlada (Philippeos, Hughes, Dhawan, & Mitry, 2012).

Uno de los factores más influyentes en el cultivo celular es la elección del medio de cultivo ya que se debe adecuar de acuerdo con las necesidades del tipo de célula o tejido que se contenga, el medio utilizado generalmente es suplementado con antibióticos y fungicidas o ambos para inhibir la contaminación. El medio puede ser clasificado en diferentes grupos basados de acuerdo con el tipo de suplementos agregados: medio con suero, medio libre de suero, medio libre de proteínas y medio definido químicamente (Yao, 2017).

Los requerimientos nutricionales varían dependiendo el tipo celular, funciones, pH y osmolaridad; así como también el tipo y cantidad de nutrientes varía conforme aumenta el crecimiento celular desde la siembra hasta la confluencia máxima (Baust et al., 2017).

En el presente trabajo como modelo celular de la cavidad oral se obtuvieron fibroblastos del ligamento periodontal humano y fueron cultivados para poder probar el efecto de la solución hiperosmótica, su citotoxicidad y posible daño celular. Para la identificación del fenotipo de fibroblastos se empleó un anticuerpo monoclonal dirigido contra fibroblastos humanos y se usó inmunofluorescencia indirecta (Mareninov, et al, 2018)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ENSAYO EN PLACA DE MICROTITULACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BIOPELICULA

Se replicó la metodología utilizada por Diogo Patricia y col (Diogo et al., 2017), con algunas adecuaciones. Se realizaron siembras de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en placas de agar BHI y Dextrosa sabouraud respectivamente con técnica de estriado para obtener colonias separadas dentro del agar para 24 horas después tomar tres colonias (ubicadas consecutivamente) e inocularlas en tubos con 5ml de caldo de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) para *E. faecalis* y RPMI-1640 para *Candida albicans*.

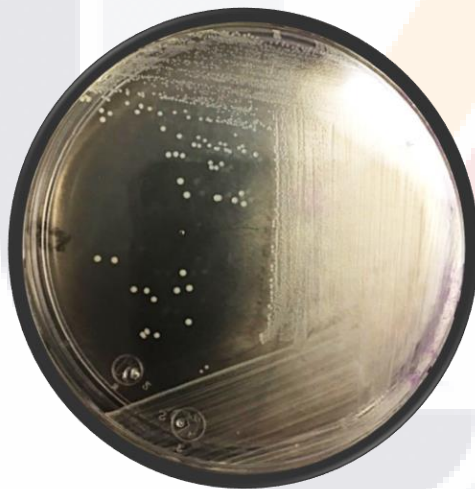


Fig. 2 Siembra de *Enterococcus faecalis* de 24 hrs de crecimiento sobre agar BHI

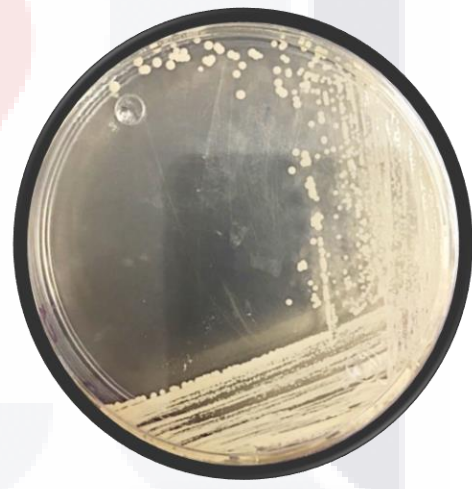


Fig. 3 Siembra de *Candida albicans* de 48 hrs de crecimiento sobre agar Dextrosa Sabouraud

Formación de Biopelícula de *Enterococcus faecalis*

Se sembraron previamente las células bacterianas (tres UFC's consecutivas) en 5ml de BHI toda la noche a 37°C. Se centrifugaron a 16000 g durante 5 minutos, se lavó dos veces en BHI estéril. Se obtuvo una suspensión bacteriana con una densidad de 1.5×10^8 bacterias/ml (0.5 McF). 200 μ l de esta suspensión se colocó en caja estéril de 96 pozos, se cubrió y se selló con parafilm y se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 37°C en agitación a 110 rpm.

Formación de Biopelícula de *Candida albicans*

Se inocularon tres UFC's consecutivas en 5 ml de Dextrosa Sabouraud y se incubaron toda la noche en un agitador orbital (120rpm) a 30°C. Se centrifugaron a 16000 g durante 5 minutos, se lavó dos veces con PBS. La pastilla final se resuspendió en RPMI-1640 a 37°C.

La suspensión celular resultante se diluyó en RPMI para obtener una suspensión final con una densidad celular de 1.0×10^6 células/ml. Se colocaron 200 μ l de la suspensión en caja de 96 pozos, se sellaron con parafilm y se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 37°C en agitación a 110 rpm.

Formación de Biopelícula mixta

Las 2 especies microbianas se dejaron crecer toda la noche y se prepararon como se describe para la biopelícula monoespecie, excepto que éstas se resuspendieron a 37°C en RPMI-1640 pre-calentado. Las 2 suspensiones bacterianas a una concentración de 1.0×10^6 cel/ml se mezclaron en RPMI-1640 en un radio de 1:1. Se colocaron 200 μ l de la suspensión en caja de 96 pozos y se incubaron a 37°C durante 24, 48 y 72 h para permitir la formación de la biopelícula.

El experimento se realizó por triplicado y por tres días consecutivos, debido a que se realizó la formación a diferentes tiempos de maduración de biopelícula, se utilizó una caja por tiempo de maduración y por día.

la configuración de la caja se realizó como se observa en las figuras 4 y 5:

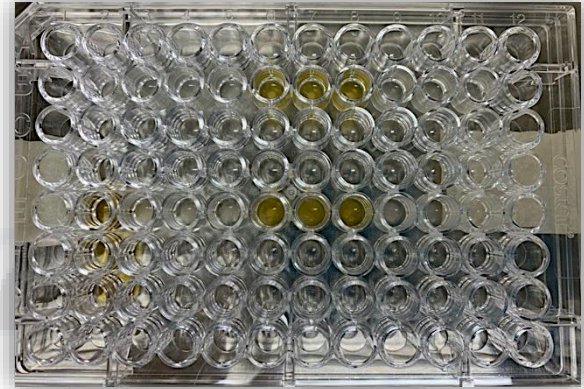
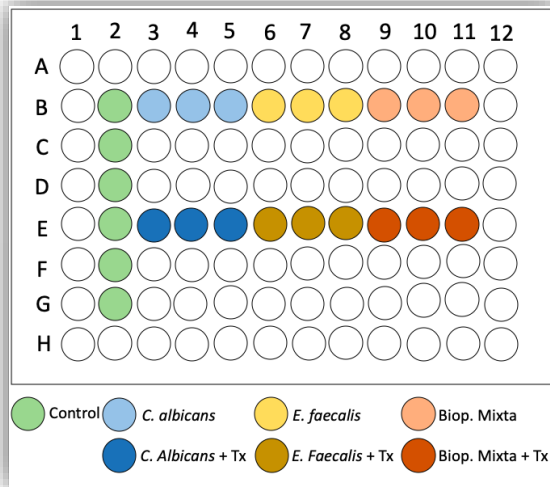


Fig. 4 Configuración de la caja de 96 pozos con acuerdo a la distribución de las muestras

Fig. 5 Caja de 96 pozos inoculada

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (24, 48 y 72 h) se realizó la prueba de contacto directo de la solución hiperosmótica por 15 min para evaluar la capacidad de disolución de biopelícula, posteriormente se realizó un enjuague con agua destilada por medio de una micropipeta multicanal cuidando tocar únicamente el centro del fondo del pozo.

Posteriormente se realizó la tinción de los pozos con cristal violeta al 0.1% por 10 minutos, en base a la metodología utilizada por Peeters E y cols (Peeters, Nelis, & Coenye, 2008) con algunas modificaciones. Una vez transcurrido el tiempo de tinción se enjuagó pozo por pozo para eliminar el exceso de colorante, para la lectura se colocaron 200 μ l de alcohol-acetona (concentración 80/20 respectivamente) en cada pozo y se resuspendió para la lectura. Los resultados se leyeron en un Lector de microplacas (BIO-RAD) a 595nm.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULA DE *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES EN LAMINILLAS DE VIDRIO.

Se realizaron siembras de *E. faecalis* y *Candida albicans* en placas de agar BHI y Dextrosa Sabouraud respectivamente con técnica de estriado para obtener colonias separadas dentro del agar para 24 hrs después tomar tres colonias (ubicadas consecutivamente) e inocularlas en tubos con 5ml de caldo de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) para *E. faecalis* y Dextrosa sabouraud para *Candida albicans*. Se realizaron 3 grupos de estudio: Biopelícula de *E. faecalis* de una maduración de 48 y 72 horas, biopelícula de *Candida albicans* de una maduración de 48 y 72 horas y una biopelícula mixta de *E. faecalis* y *C. Albicans* de una maduración de 48 y 72 horas.

En cajas Petri estériles se colocó una laminilla previamente esterilizada, y se colocaron 2.5ml de caldo de cultivo previamente inoculado con el microorganismo de interés, posteriormente se agregaron 25ml de medio de cultivo fresco y se llevaron a incubar por el tiempo correspondiente (48 y 72 horas).

Posterior al tiempo de incubación se extrajo la laminilla con cuidado de que no resbale la biopelícula, se realizó la fijación al fuego con ayuda de un mechero, consecutivamente se sumergió en alcohol al 80% por 20 minutos, al terminar el tiempo se dejó secar y se tiñó con Film Tracer FM 1-43 Green Biofilm Cell Stain de acuerdo a las especificaciones del fabricante (se colocó sobre la biopelícula por 30 minutos en cámara húmeda y en oscuridad) en las biopelículas de *E. faecalis* y biopelículas mixtas; en el caso de las biopelículas de *C. Albicans* y biopelículas mixtas, se colocó SYPRO Ruby Protein Gel Stain de acuerdo a las especificaciones del fabricante (se colocó sobre la biopelícula por 30 minutos en cámara húmeda y en oscuridad). Posteriormente se enjuagaron cuidadosamente con agua estéril y se dejaron secar para consecutivamente ser montadas con una pequeña gota de ProLong Gold y se sellaron con ayuda de esmalte; Se observaron con Microscopio Confocal (LSM 700, Carl Zeiss)

3.3 ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN PRE Y POST TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULA DE *Candida albicans*, *Enterococco faecalis* Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Se realizó el mismo protocolo utilizado para la caracterización de las biopelículas mencionado anteriormente, a diferencia que al cumplirse el tiempo de maduración (48 y 72 horas), se realizó la prueba de contacto de la biopelícula con las soluciones.

Se eliminó el medio de cultivo con ayuda de una pipeta evitando despegar la biopelícula, consecutivamente se realizó la prueba de contacto directo. Se organizaron tres grupos el control positivo con agua destilada estéril, el control negativo tratado con hipoclorito de sodio al 5.25% y el grupo experimental tratado con la solución hiperosmótica.

Las soluciones estuvieron en contacto por 15 min y al término del tiempo se retiró la laminilla con cuidado y con ayuda de pinzas estériles se enjuagó suavemente para eliminar el exceso de solución, se realizó la fijación al fuego con ayuda de un mechero, consecutivamente se sumergió en alcohol al 80% por 20 minutos, al terminar el tiempo se dejó secar y se tiñó con Film Tracer FM 1-43 Green Biofilm Cell Stain de acuerdo a las especificaciones del fabricante (se colocó sobre la biopelícula por 30 minutos en cámara húmeda y en oscuridad) en las biopelículas de *E. faecalis* y biopelículas mixtas; en el caso de las biopelículas de *C. Albicans* y biopelículas mixtas, se colocó SYPRO Ruby Protein Gel Stain de acuerdo a las especificaciones de acuerdo al fabricante (se colocó sobre la biopelícula por 30 minutos en cámara húmeda y en oscuridad). Posteriormente se enjuagaron cuidadosamente con agua estéril y se dejaron secar para consecutivamente ser montadas con una pequeña gota de ProLong Gold y se sellaron con ayuda de esmalte; el ensayo fue realizado por triplicado. Se observaron con microscopía confocal, realizando un barrido de observación sobre toda la muestra y se realizaron tres tomas al azar de cada biopelícula. Una vez obtenidas las imágenes de cada una de las biopelículas se utilizó el programa Image J para la cuantificación de la

biopelícula pre y post tratamiento. Posteriormente las cuantificaciones se llevaron al programa Prism Graphad 8 para el análisis estadístico.

3.4 ENSAYO EN LAMINILLAS DE BIOPELÍCULA DE *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES PARA CONTEO DE UFC

Se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente para la caracterización excepto que posterior al tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo con ayuda de una pipeta evitando despegar la biopelícula, consecutivamente se realizó la prueba de contacto directo. (Figura 6). Como se describió en la parte anterior se realizaron tres grupos el control positivo tratado con agua destilada estéril, el control negativo tratado con hipoclorito de sodio al 5.25% y el grupo experimental tratado con la solución hiperosmótica.

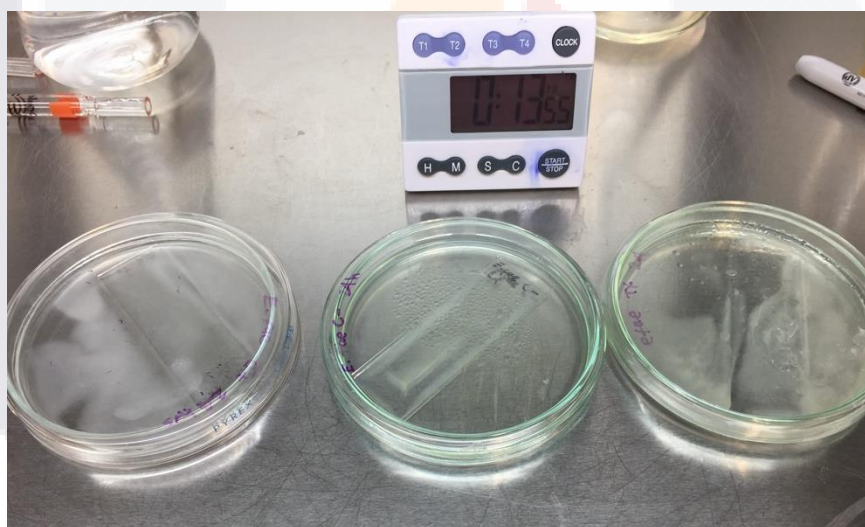


Fig. 6 Biopelículas en contacto con las soluciones (solución hiperosmótica, NaOCl 5.25% y Agua destilada estéril)

Todas las soluciones estuvieron en contacto por 15 minutos, al término del tiempo se retiró la laminilla con cuidado con ayuda de pinzas estériles y se enjuagó suavemente para eliminar el exceso de solución, posteriormente con 2 ml de agua destilada estéril se re suspende la biopelícula adherida a la laminilla de la cual se tomó para realizar diluciones, posteriormente se realizaron siembras en cajas de

agar BHI, BHI/Dextrosa y Dextrosa sabouraud y consecutivamente a las 24 horas se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). (Tabla 1)

3.5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD SOBRE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Para la realización del ensayo se obtuvieron fibroblastos utilizados previamente de la tesis de Bravo y cols titulada: “Evaluación de la genotoxicidad producida por un sellador a base de mta adicionado con AgNPs” los cuales fueron obtenidos de ligamento periodontal de terceros molares extraídos de pacientes de la clínica de cirugía de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Para corroborar la naturaleza de dichas células se realizó la identificación de las mismas tomando como base el artículo “An Immunohistochemical Method for Identifying Fibroblasts in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue” (Goodpaster et al., 2008), en cual utilizaron el anticuerpo primario monoclonal TE-7 mouse anti-human fibroblast monoclonal antibody (CHEMICON, Millipore) para identificar fibroblastos.

3.6 IDENTIFICACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA, EMPLEANDO UN ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECÍFICO.

Se realizó el descongelado de células el cual fue realizado como sigue:

Se colocó el criotubo a baño maría a una temperatura de 37° C para lograr el descongelado, posteriormente el contenido fue transferido a un tubo eppendorf por medio de una pipeta de 1000 microlitros, una vez transferido se llevó a centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con medio fresco, posteriormente se colocó en la caja de cultivo y

se complementó con medio. Se monitorizaron las cajas de cultivo hasta que se observó una confluencia de 80% o mayor (Figura 7).



Fig. 7 Confluencia de los fibroblastos en cultivo mayor al 80%. Aumento Total: 100.

Posteriormente para observar las células en portaobjetos se prepararon cajas para montaje: El día anterior al procedimiento se colocaron cubreobjetos en alcohol al 97%, 24 horas después se secaron los cubreobjetos del alcohol con una gasa estéril, se colocó 1 gota de Poli-L-Lisina para cubrir toda la superficie, se dejó 10 minutos y se retiró el exceso de Poli-L-Lisina, se dejó secar durante 10 minutos, posteriormente en una caja de cultivo celular de fondo plano (Corning™) de 6 pozos se colocó un cubreobjetos en cada pozo y 1.5 ml de medio DMEM (suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomycin). Una vez completado este proceso, del cultivo de fibroblastos sembrado previamente y confluyente, se realizó el levantamiento de las células para sembrarlas posteriormente en la caja de 6 pozos, por lo cuál se retiró el medio y se lavó con PBS (5 ml), se colocaron 5 ml de tripsina al .25% por 5 minutos, posteriormente se resuspendió y se lavó la caja con la misma tripsina para asegurar el levantamiento de todas las células, se transfirió a tubo de 15 ml y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se tiró por decantación la Tripsina y se resuspendió la pastilla en 4 ml de medio, después se

colocaron 0.5 ml de suspensión celular en cada pozo (que previamente ya tenía el cubreobjetos) y se dejó crecer por 24 horas.

- Procedimiento de inmunofluorescencia:

Se retiró el medio y se lavó con PBS-TWEEN 1 vez durante 5 minutos, se fijó con 2ml de Acetona fría por 3 minutos, posteriormente se lavó con PBS-TWEEN 3 veces durante 5 minutos, se incubó con Triton X-100 en PBS durante 15 minutos y posteriormente se lavó con PBS-TWEEN 3 veces durante 5 minutos, se incubó con albúmina al 0.1% (Solución bloqueadora) durante 1 hora a Temperatura ambiente y se añadió anticuerpo primario monoclonal (TE-7, *mouse anti-human fibroblast monoclonal antibody*, CHEMICON, Millipore) a una concentración de 1:50 y se incubó a 4°C toda la noche en agitación (ROCKER 25, Labnet). Posteriormente se lavó con PBS-TWEEN 3 veces durante 5 minutos y se incubó con anticuerpo secundario (Fluoróforo Alexa 488 Dilución 1:500) en Cámara Obscura Húmeda durante 2 horas a Temperatura ambiente, se lavó con PBS-TWEEN 3 veces durante 5 minutos y se tiñeron los núcleos con 0.5ml de DAPI, se dejó incubando durante 15 minutos a Temperatura ambiente, posteriormente se lavó con PBS-TWEEN 3 veces durante 5 minutos. Se desinfectó un portaobjetos con alcohol y se dejó secar para el montaje de la muestra. Para el montaje de la muestra se colocó una microgota de Medio de Montaje en el cubreobjetos con células fijadas en el portaobjetos. Se llevó a cabo la observación por medio del microscopio de fluorescencia Olympus IX51.

3.7 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD MTT

Se realizó el descongelado de los fibroblastos por medio de inmersión del vial a baño maría a una temperatura de 37°C, una vez descongelado se transfirió el mililitro de células a un tubo eppendorf estéril y se llevó a centrifugar a 3000 revoluciones por minuto, se tiró el sobrenadante por medio de decantación y se resuspendieron las células en 1 ml de medio DMEM (suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomina), posteriormente se sembraron en

caja Petri con 9ml de medio DMEM, se realizaron recambios de medio cada 48 hrs hasta observar una confluencia celular mayor al 80% .

Una vez que las cajas de cultivo llegaron a confluencia se realizó el levantamiento de las células para sembrarlas posteriormente en una caja de 96 pozos.

Se realizó un lavado con PBS de cada caja de Petri, posteriormente se colocó 5ml de tripsina al .25% por 5 min a 37°C, una vez transcurrido el tiempo se colocó esta mezcla en un tubo de 15ml y se llevó a centrifugar a 3000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante por centrifugación y se inactivo la tripsina con medio de cultivo DMEM.

Para realizar el ensayo de citotoxicidad por medio del ensayo de MTT, se decidió sembrar en la caja de 96 pozos, en la cual debía haber una concentración de 10^4 células por pozo; para obtener esta concentración se realizó un conteo celular por medio de cámara de Neubauer y azul de tripán.

Una vez sembradas las células en la caja de 96 pozos, se dejaron incubar por 24 horas, posteriormente se observaron por medio del microscopio invertido para corroborar la presencia y adherencia celular.

Se retiró el medio de cultivo con cuidado, y se realizó un lavado con 200 microlitros de PBS, posteriormente se realizó el contacto de la soluciones por lo que se determinaron 4 grupos. El grupo experimental tratado con la solución hiperosmótica, el control negativo tratado con hipoclorito de sodio al 5.25%, células tratadas con hipoclorito de sodio al 2.5% y como control positivo células en PBS. Todos los tratamientos se hicieron a diferente tiempo 30, 60, 90, 120, 150 minutos, y 3 h de tratamiento.

Se siguieron las recomendaciones según el fabricante (Cell proliferation Kit I MTT Roche). Se colocaron 200 microlitros de la solución de prueba en cada pozo. Se llevaron a incubación a 37°C con 1.5 de O₂ durante el tiempo de contacto, una vez transcurrido el tiempo de contacto se eliminó la solución de prueba y se realizaron dos lavados con PBS para eliminar los restos de solución, posteriormente se colocaron 90 microlitros de RPMI 1640 (para evitar modificaciones de coloración) y 10 microlitros del reactivo MTT, se metieron a incubación a 37°C con 1.5 de O₂, por 4 horas, consecutivamente se agregaron 100 microlitros de solución solubilizante y

se metieron a incubar toda la noche para leer al día siguiente en un lector de microplacas a una longitud de 595 nm.

Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado para obtener homogeneidad de los resultados.

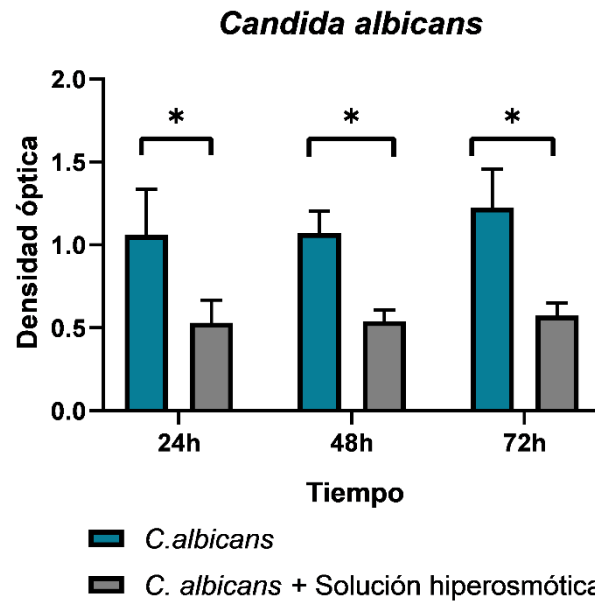
4. RESULTADOS

4.1 ENSAYO EN PLACA DE MICROTITULACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BIOPELICULA

Los resultados obtenidos del análisis de cuantificación por medio de densidad óptica, son los siguientes:

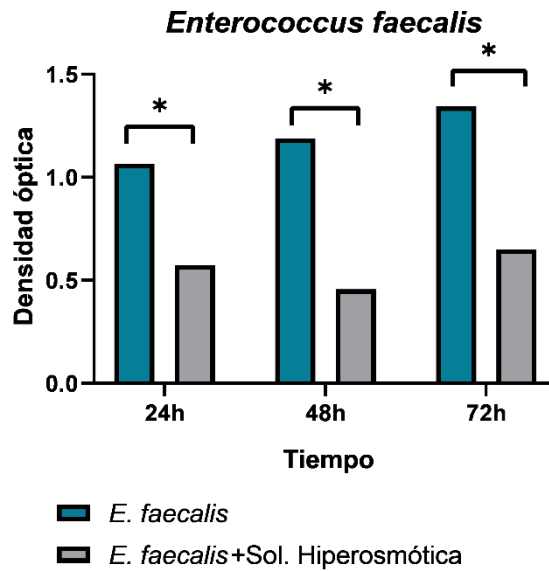
El análisis estadístico se llevo a cabo con el programa GraphPad Prism 8, se realizó la prueba estadística ANOVA de 2 vías para cada una de los grupos de biopelículas.

En el grupo de *Candida albicans* se observó el aumento de la cantidad de biopelícula según avanzaba el tiempo de incubación; así mismo se observó una disminución en la densidad óptica posterior a la prueba de contacto directo de la solución hiperosmótica en los tres grupos (24, 48 y 72 hrs), mostrando una diferencia significativa en cada uno de los grupos siendo para el grupo de 24 hrs hubo una diferencia significativa de $p < 0.0016$, $p < 0.0016$ para la biopelícula de 48 hrs y $p < 0.002$ para la biopelícula de 72 hrs. (Gráfica 1)



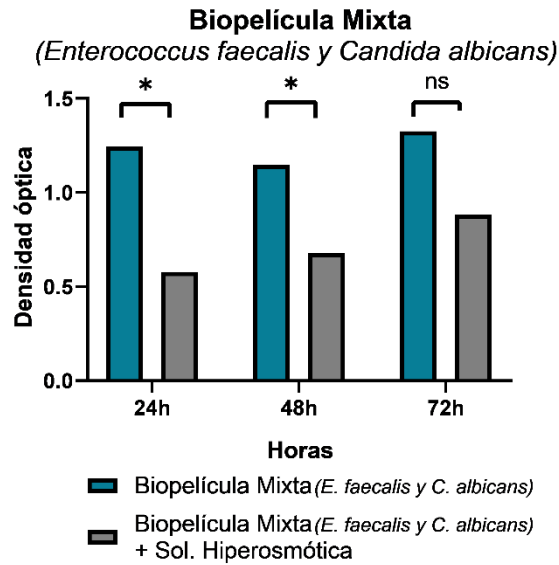
Gráfica 1. Crecimiento de la biopelícula de *Candida albicans* cuantificada a través de densidad óptica. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hipertónica. Los valores con significancia están marcados con (*).

En cuanto a la biopelícula de *Enterococcus faecalis* observamos al igual que en la biopelícula de la levadura, que la cantidad de biopelícula fue en aumento conforme pasaron los tiempos incubación, mostrando así la viabilidad de las cepas, además en los tres tiempos de incubación se obtuvo diferencia significativa en cuanto a la disminución de biopelícula al contacto con la solución de prueba; obtuvimos un $p < 0.0069$ en la biopelícula de 24 hrs, $p < 0.002$ en la de 48 hrs y $p < 0.003$ en la biopelícula de 72 hrs. (Gráfica 2)



Grafica 2. Crecimiento de la biopelícula de *Enterococcus faecalis* cuantificada a través de densidad óptica. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica. Los valores con significancia están marcados con (*).

En la biopelícula mixta de *E. faecalis* y *C. albicans* observamos una disminución de biopelícula en cada uno de los tiempos de maduración, mostrando una diferencia significativa en la biopelícula de 24 y 48 hrs ($p < 0.0038$ y $p < 0.0436$ respectivamente); sin embargo en la biopelícula de 72hrs aunque hubo disminución de biopelícula no obtuvimos un resultado significativo $p > 0.0569$. (Gráfica 3)



Gráfica 3. Crecimiento de la biopelícula de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* cuantificada a través de densidad óptica. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica. Los valores con significancia están marcados con (*).

4.2 CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULA DE *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES EN LAMINILLAS DE VIDRIO

Se examinaron cada una de las laminillas con la biopelícula, observando la cantidad de biopelícula, así como su estructura y distribución.

Se obtuvo información suficiente para poder llevar a cabo los experimentos de prueba de contacto. Obteniendo las siguientes observaciones formación de biopelícula sobre la superficie del cubreobjetos, grosor de la biopelícula que permitiera la realización de las pruebas, aumento del grosor de la biopelícula observado a las 24 y 48 h, así como mantenimiento del grosor a las 72 h.

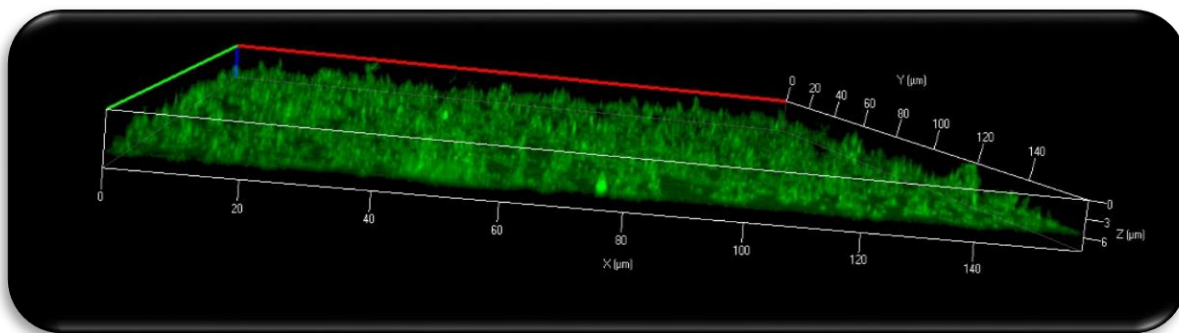


Fig. 8 Biopelícula de *E. faecalis* de 48 h de maduración, marcada con Film Tracer, tomada en tercera dimensión para mostrar el grosor alcanzado por la biopelícula.

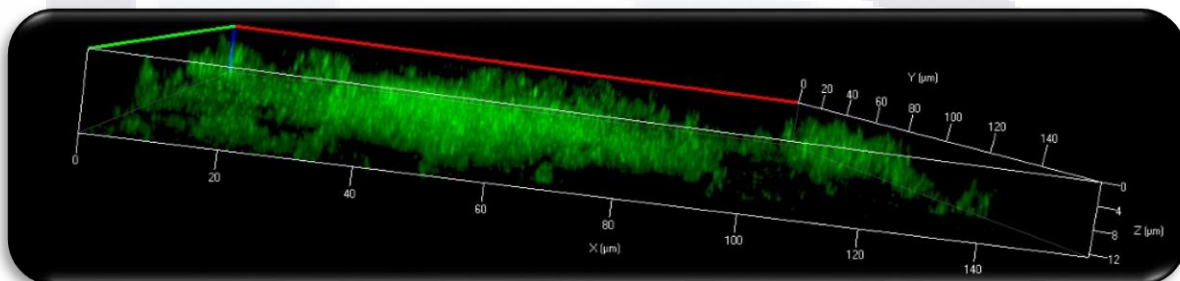


Fig. 9 Biopelícula de *E. faecalis* de 72 h de maduración, marcada con Film Tracer, tomada en tercera dimensión para mostrar el grosor alcanzado por la biopelícula.

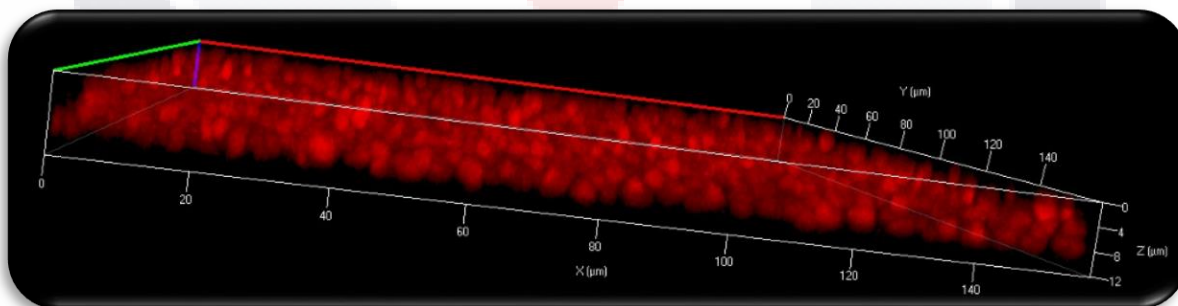


Fig. 10 Biopelícula de *C. albicans* de 48 h de maduración, marcada con Sypro Ruby BMS, tomada en tercera dimensión para mostrar el grosor alcanzado por la biopelícula.

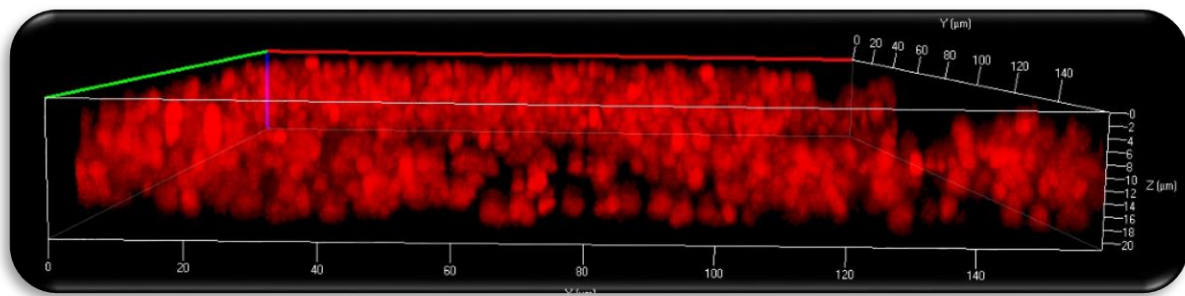


Fig. 11 Biopelícula de *C. albicans* de 72 h de maduración, marcada con Sypro Ruby BMS, tomada en tercera dimensión para mostrar el grosor alcanzado por la biopelícula.

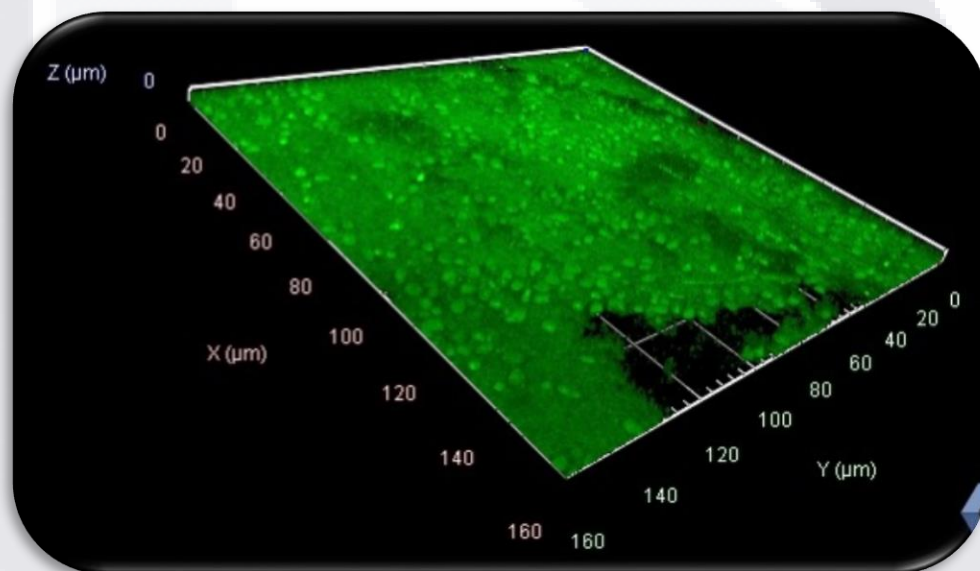


Fig. 12 Biopelícula de *E. faecalis* y *C. albicans* de 48 h de maduración, marcada con Film Tracer, tomada en tercera dimensión para mostrar la estructura y conformación tridimensional de la biopelícula.

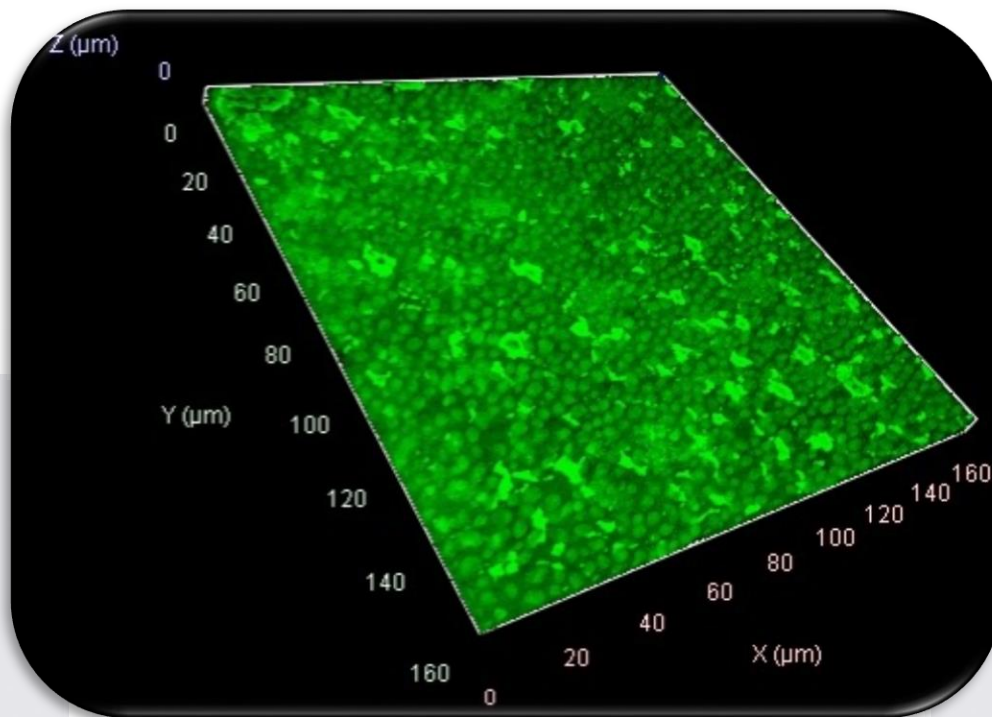
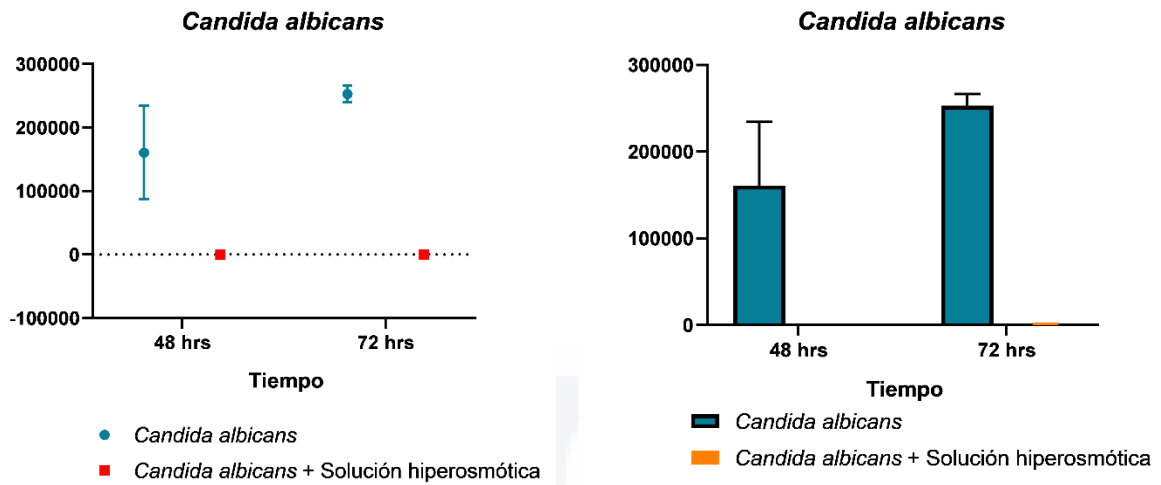


Fig. 13 Biopelícula de *E. faecalis* y *C. albicans* de 72 h de maduración, marcada con Film Tracer, tomada en tercera dimensión para mostrar la estructura y conformación tridimensional de la biopelícula.

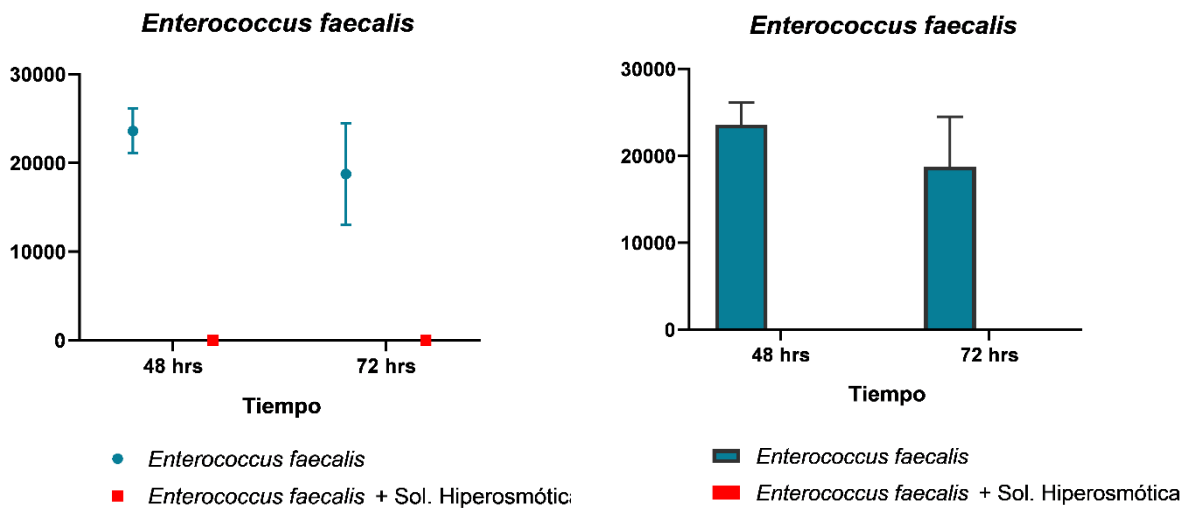
4.3 ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN PRE Y POST TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULA DE *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES POR MICROSCOPIA CONFOCAL

La cuantificación de las biopelículas realizada por el programa Image J, arrojó resultados visibles y cuantificables en beneficio de la solución hiperosmótica, Para la biopelícula de *C. albicans* se observó una reducción significativa del grosor y cantidad de biopelícula mostrando una diferencia significativa de $P < 0.0254$ para la biopelícula de 48 horas y $P < 0.0051$ para la de 72 horas. (Gráfica 4)



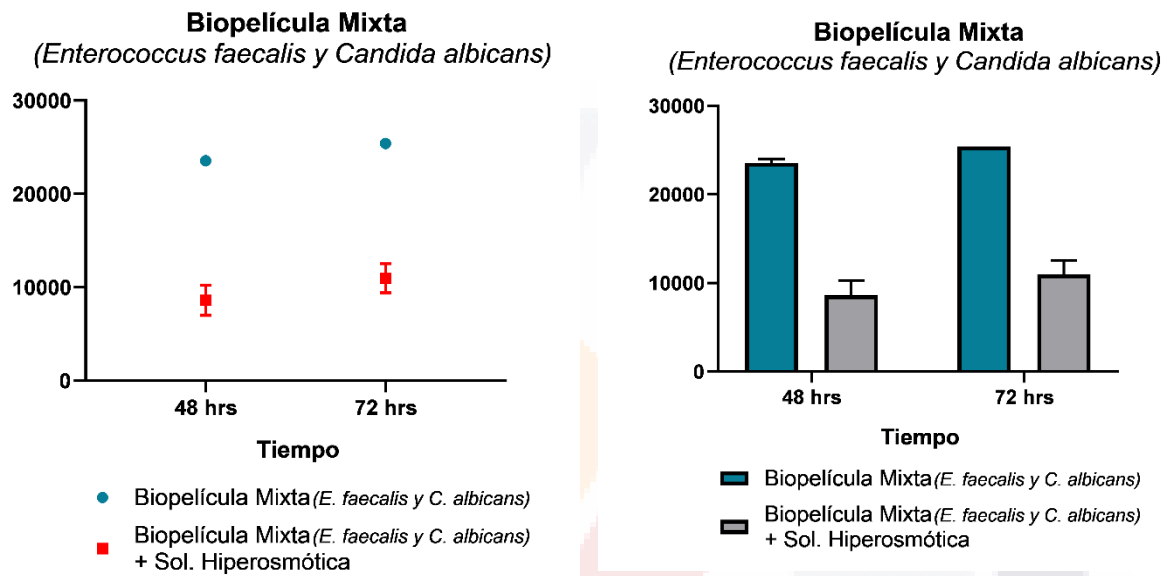
Gráfica 4. Crecimiento de la biopelícula de *Candida albicans*. La biopelícula fue cuantificada a través de microscopía confocal con el sistema Image J. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica

En cuanto a la biopelícula de *E. faecalis* se obtuvo una diferencia significativa de $P < 0.0033$ para la biopelícula de 48 horas y $P < 0.0078$ para la biopelícula de 72 horas. (Gráfica 5)



Gráfica 5. Crecimiento de la biopelícula de *Enterococcus faecalis*. La biopelícula fue cuantificada a través de microscopía confocal con el sistema Image J. En ambas gráficas se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución

En la biopelícula mixta se observó una disminución significativa al igual que en las biopelículas uniespecie, sin embargo aunque el resultado sea significativo se observó que la biopelícula no se eliminó tan efectivamente como en las biopelículas uniespecie. Se obtuvo una $P < 0.004$ para la biopelícula de 48 horas y $P < 0.005$ para la de 72 horas. (Gráfica 6)



Gráfica 6. Crecimiento de la biopelícula mixta de *Enterococcus faecalis* con *Candida albicans*. La biopelícula fue cuantificada a través de microscopía confocal con el sistema Image J. Se observa la comparación entre una biopelícula sin tratamiento y otra tratada con la solución hiperosmótica

4.4 ENSAYO EN LAMINILLAS DE BIOPELÍCULA DE *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* Y BIOPELÍCULA MIXTA DE AMBAS ESPECIES PARA CONTEO DE UFC

Los resultados obtenidos por medio de conteo de ufc's para la biopelícula de *Candida albicans* en sus dos tiempos de maduración (48 y 72 horas) al estar en contacto con la solución de prueba fueron favorables para ésta ya que no hubo crecimiento de ninguna ufc, comparado con el grupo control de hipoclorito de sodio al 5.25%, el mismo resultado fue obtenido con la biopelícula de *Enterococco faecalis* en sus dos tiempos de maduración; así como con la biopelícula mixta en la cual el control negativo (hipoclorito de sodio al 5.25%) fue muy comparable con la solución de prueba. Los resultados con el número de UFC se observan en la Tabla 1

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS				
	HORAS	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	B. Mixta
Control	48	54	64	42
	72	21	52	45
Tratamiento	48	0	0	0
	72	0	0	0

Tabla 1. Muestra el número de UFCs comparando el grupo control con el grupo tratado con la solución hiperosmótica.

4.5 CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO

Se obtuvieron imágenes del microscopio de fluorescencia (Olympus IX51), las cuales mostraron positividad a la técnica de inmunofluorescencia con el uso del anticuerpo primario TE-7, mouse anti-human fibroblast monoclonal antibody, CHEMICON, millipore, se observaron fibroblastos de coloración verde (Alexa 488) en su estructura general y el núcleo color azul (DAPI) (Figura 14)

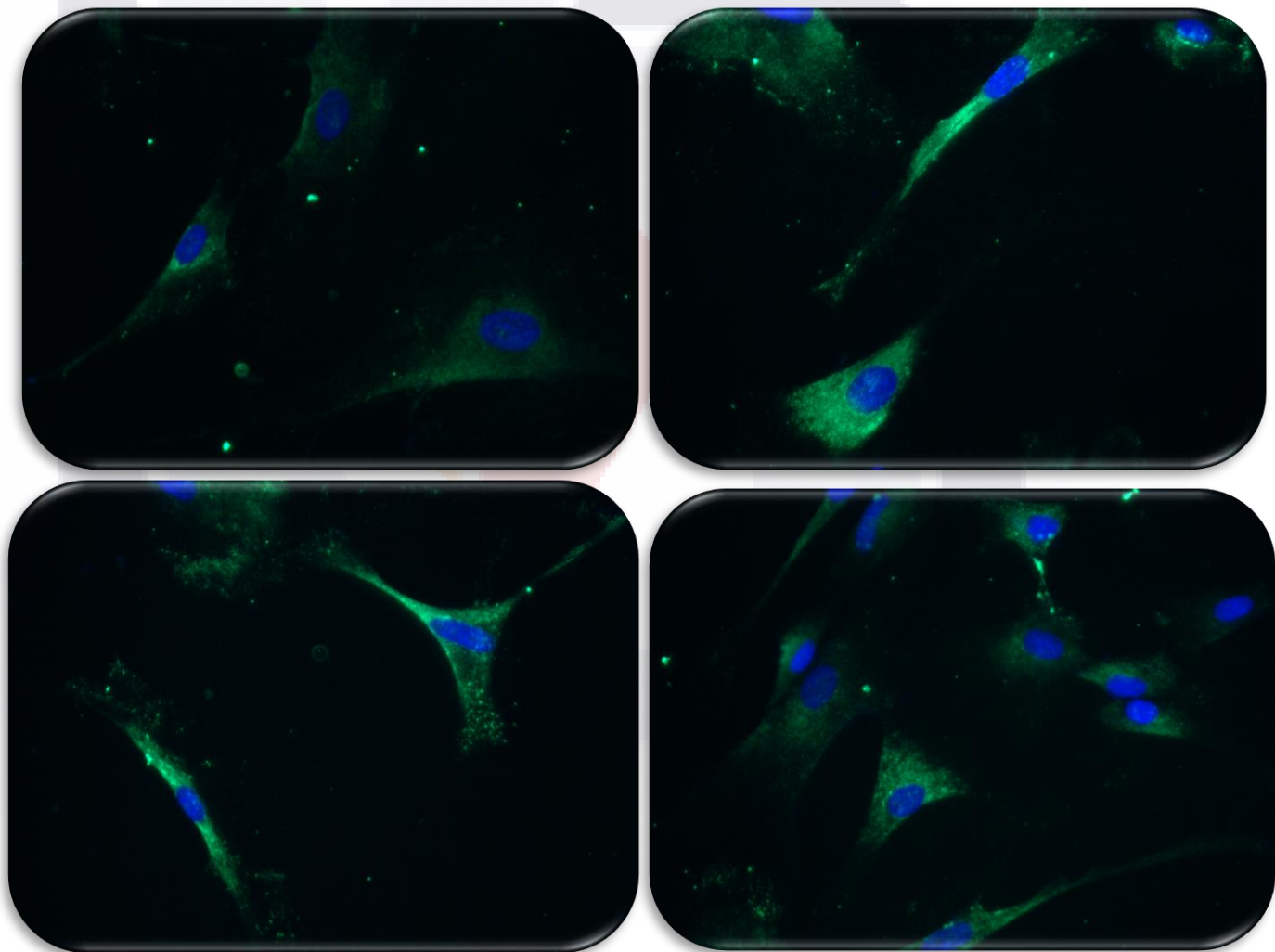


Fig. 14 Imágenes observadas en microscopio de fluorescencia a un aumento de 60X, observándose la positividad del anticuerpo, así como la morfología propia del fibroblasto.

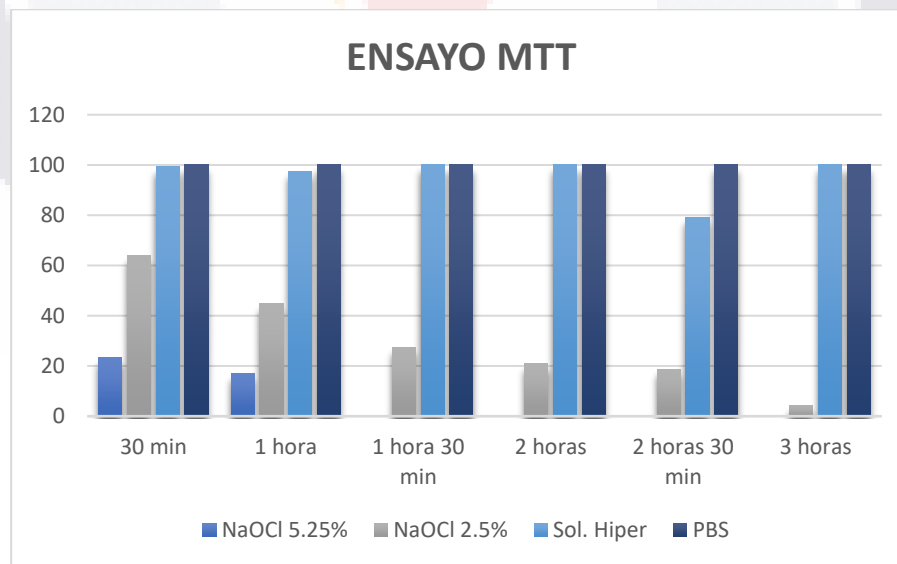
4.6 ENSAYO MTT

Los resultados de viabilidad celular se muestran en la Gráfica 7 las células de ligamento periodontal fueron expuestas a diferentes soluciones de prueba: hipoclorito de sodio al 5.25% (control negativo), hipoclorito de sodio al 2.5%, solución hiperosmótica y PBS (control positivo) por 30 minutos, 1 hora , 1 hora 30 minutos, 2 horas, 2 horas 30 minutos y 3 horas.

Para obtener porcentaje de viabilidad se realizó la siguiente formula:

$$\% \text{ células viables} = \frac{(\text{Abs ensayo} - \text{Abs blanco})}{(\text{Abs control} - \text{Abs blanco})} \times 100$$

Según los resultados obtenidos, el comportamiento de la solución hiperosmótica fue muy similar al grupo control (PBS) demostrando que no existe daño a las células del hospedero, a diferencia del grupo de comparación (NaOCl 2.5%) el cual se vió disminuido en los primeros 2 tiempos de contacto (30 minutos y 1 hora) en comparación con el grupo control y la solución hiperosmótica, mostrando signos de no viabilidad a las 2 horas.



Gráfica 7. Muestra el porcentaje de viabilidad celular obtenida del ensayo MTT

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizaron diferentes tipos de experimentos: capacidad de disolución de la biopelícula en caja de 96 pozos, capacidad de eliminar biopelícula sobre laminillas de vidrio medida por medio de microscopia confocal, capacidad antibacteriana de la solución hiperosmótica medida por medio de UFCs y viabilidad celular de fibroblastos al estar en contacto con la solución hiperosmótica, por medio del ensayo de MTT. Ensayos que nos han brindado información para conocer el comportamiento de la solución hiperosmótica.

El efecto de la solución hiperosmótica sobre la biopelícula por medio de UFC's y densidad óptica fue comparada con el irrigante conocido en endodoncia actualmente como el estándar de oro, el hipoclorito de sodio, el cual tiene excelentes propiedades antibacterianas y buena capacidad de disolución de materia orgánica; se utilizaron dos especies de microorganismos: *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, las cuales son dos microorganismos que han mostrado ser resistentes a la medicación intraconducto con Hidróxido de calcio e incluso al tratamiento endodóntico mismo ya que estos microorganismos han sido aislados de conductos radiculares cuando ya han sido tratados previamente (Siqueira & Rôças, 2008).

La tinción con cristal violeta es un ensayo simple colorimétrico ampliamente utilizado para el estudio de biopelículas, permitiendo la rápida cuantificación de la biopelícula, este método permite la tinción tanto de células viables como muertas, la tinción que produce es medida por medio de un lector de placas de ELISA, permitiéndonos cuantificar la cantidad de biopelícula ya que la densidad óptica medida es directamente proporcional a la cantidad de biopelícula contenida, en este caso en una placa de microtitulación, comparando así la cantidad de biopelícula contenida en nuestros grupos control con la cantidad de biopelícula restante en nuestros grupos experimentales (Peeters et al., 2008).

La solución hiperosmótica fue efectiva en la disolución de las biopelículas de *E. faecalis* y *C. albicans* en casi todos los tiempos de maduración mostrando la capacidad que ésta posee para la eliminación bacteriana y comparando los resultados de las cajas de microtitulación con el conteo de UFC podemos afirmar

que aunque la solución hiperosmótica no tiene la capacidad de disolución de biopelícula al 100%, ésta tiene capacidad antibacteriana ya que como se mostró en la tabla 4 obtuvimos un conteo nulo de UFC's, este resultado se compara con Falla y Cols en el cual en biopelículas en estado planctónico con ayuda de la solución hiperosmótica demuestran el efecto antimicrobiano de la solución (Falla et al., 2019) En la biopelícula mixta de 72 horas de maduración no obtuvimos una diferencia significativa en cuanto a reducción de biopelícula, sin embargo si hubo disminución de ésta, por lo que podemos suponer que debido a la maduración de la biopelícula y que está compuesta por mas de 1 especie, tal vez requiera de mayor tiempo de exposición de la solución. Además que el presente estudio fue realizado en forma estática, el cual llevado a la realidad clínica faltaría la parte biomecánica la cual es una parte esencial para el éxito del tratamiento endodóntico. (Metzger, Solomonov, & Kfir, 2013)

En las imágenes tridimensionales por medio de microscopia confocal pudimos observar que la cantidad y el grosor de la biopelícula disminuye considerablemente después de estar expuestas a la solución hiperosmótica, a diferencia de la biopelícula contenida en los pozos de las placas de microtitulación, éstas están un poco mas friables, sin embargo con la manipulación adecuada pudimos re suspender la biopelícula remanente y realizar las siembras correspondientes para el conteo de UFC's, concluyendo que aunque no elimina por completo la biopelícula tiene buena capacidad antibacteriana ya que no obtuvimos crecimiento de ninguna UFC, tanto en el grupo de la solución hiperosmótica como en el grupo del hipoclorito de sodio al 5.25% utilizado como control negativo.

La evaluación por medio de microscopia confocal laser es una herramienta muy útil ya que se pueden observar las biopelículas en una reconstrucción tridimensional por medio de cortes que atraviesan la biopelícula en todo su espesor, además que el uso de la microscopia confocal permite la visualización del grosor y la distribución de las células en la estructura de la biopelícula, éste emplea laser como fuente de luz, en este caso utilizamos tinciones que tienen la capacidad de teñir la matriz extracelular de las biopelículas resultando una herramienta útil para la observación y cuantificación de nuestras biopelículas, al igual que el estudio de Del Carpio y Cols

en el cual ellos también hicieron la evaluación de irrigantes sobre biopelículas orales (Del Carpio-Perochena et al., 2014).

El ensayo de toxicidad fue realizado sobre células de ligamento periodontal humano, sobre fibroblastos específicamente. Los fibroblastos son el tipo celular predominante del tejido conectivo del ligamento periodontal el cual esta compuesto principalmente de fibroblastos, éstos son responsables de la formación y mantenimiento del ligamento periodontal incluso de su reparación, remodelación y regeneración del hueso alveolar adyacente (Kuru, Parkar, Griffiths, Newman, & Olsen, 1998), la elección del tipo celular fue debido a que los irrigantes endodónticos pueden llegar a estar en contacto con el ligamento periodontal si éste llegase a extruírse mas allá del ápice radicular, por lo tanto es importante realizar la evaluación de la solución hiperosmótica sobre células de ligamento periodontal humano. Al realizar el ensayo de MTT se observó un buen comportamiento de la solución hiperosmótica sobre los fibroblastos de ligamento periodontal humano ya que el porcentaje de viabilidad se mantuvo muy cercano al 100% como pudimos observar en la grafica 7, excepto a las 2 horas con 30 minutos en el cual observamos una disminución hasta el 79%, lo cual nos puede indicar que debido al contacto continuo del choque hiperosmótico producido en la célula su viabilidad disminuyó, debido a que algunos tipos de células pueden sobrevivir moderadamente a un ambiente hipertónico gracias a un proceso de adaptación llamado osmoregulación, resultando en una acumulación de osmolitos compatibles, este proceso involucra reacciones que pueden suceder en segundos o minutos e incluso respuestas retardadas que se pueden presentar horas o incluso días después, gracias a este mecanismo observamos que los fibroblastos de ligamento periodontal tuvieron la capacidad de osmoregularse y así pudimos distinguir un aumento en la viabilidad a las 3 horas de contacto. (Alfieri & Petronini, 2007)

Como según indica la norma ISO 10993-5:2009 si la viabilidad celular es menor a 70% el material de prueba debe ser considerado como citotóxico para ese tipo celular, por lo cual según los resultados obtenidos en el presente, podemos concluir que la solución hiperosmótica carece de efectos citotóxicos en las células de ligamento periodontal humano

6. CONCLUSIONES

1. Es posible realizar una biopelícula mixta de *E. faecalis* y *C. albicans* con sus condiciones específicas para lograr un buen crecimiento y comensalismo.
2. La solución hiperosmótica tiene efectiva capacidad antimicrobiana contra *E. faecalis*, *C. albicans* y contra una biopelícula mixta de ambas especies.
3. La solución hiperosmótica carece de efectos citotóxicos sobre células de ligamento periodontal humano.
4. Se aceptaron las hipótesis de investigación 1 y 2.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahangari, Z., Bidabadi, M. M., Asnaashari, M., Rahmati, A., & Tabatabaei, F. S. (2017). Comparison of the Antimicrobial Efficacy of Calcium Hydroxide and Photodynamic Therapy Against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in Teeth With Periapical Lesions; An In Vivo Study. *Laser Application in Medical Sciences Research Center*, 8(2), 72–78.
<https://doi.org/10.15171/jlms.2017.13>
- Alfieri, R. R., & Petronini, P. G. (2007). Hyperosmotic stress response: Comparison with other cellular stresses. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 454(2), 173–185.
<https://doi.org/10.1007/s00424-006-0195-x>
- Arencibia Arrebola, D. F., Rosario Fernandez, L. A., & Curveco Sanchez, D. L. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia , algunas consideraciones y su utilidad . *Revista Toxicológica En Línea*, 40–52.
- Basrani, B., & Haapasalo, M. (2012). Update on endodontic irrigating solutions. *Endodontic Topics*, 27, 74–102.
<https://doi.org/10.1111/etp.12031>
- Baust, J. M., Buehring, G. C., Campbell, L., Elmore, E., Harbell, J. W., Nims, R. W., ... Simione, F. (2017). Best practices in cell culture : an overview. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal*.
<https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>
- Beales, N. (2004). Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures , Weak Acid Preserva- tives , Low pH , and Osmotic Stress : A Review. *Comprehensive Reviews in Food Sciencie and Food Safety*, 3, 1–20.
- Chan, E. L. K. (2015). Cytotoxicity of a novel nano-silver particle endodontic irrigant, 65–74.
- Choe, K. P., & Strange, K. (2008). Genome-wide RNAi screen and in vivo protein aggregation reporters identify degradation of damaged proteins as an essential hypertonic stress response, 2520, 1488–1498. <https://doi.org/10.1152/ajpccell.00450.2008>.
- Del Carpio-Perochena, A., Bramante, C. M., Hungaro Duarte, M. A., de Andrade, F. B., Cavenago, B. C., Villas-Bôas, M. H., ... Amoroso-Silva, P. (2014). Application of laser scanning microscopy for the analysis of oral biofilm dissolution by different endodontic irrigants. *Dental Research Journal*, 11(4), 442–447.

- <https://doi.org/10.4103/1735-3327.139417>
- Diogo, P., Fernandes, C., Caramelo, F., Mota, M., Miranda, I. M., Faustino, M. A. F., ... Gonçalves, T. (2017). Antimicrobial photodynamic therapy against endodontic *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* mono and mixed biofilms in the presence of photosensitizers: A comparative study with classical endodontic irrigants. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00498>
- Falla, V. M. G., Amaro, A. M. G., Ortega, O. G., Cárdenas, J. M., Cantú, F. J. G., Noyola, M. V., & Rodríguez, R. O. (2019). Antimicrobial effect of a hyperosmotic solution on endodontic microorganisms in planktonic state. *Investigacion Clinica (Venezuela)*, 60(1), 38–46. <https://doi.org/10.22209/IC.v60n1a04>
- Finan, J. D., & Guilak, F. (2010). The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. *J Cell Biochem*, 109(3), 460–467. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Genevaux, P., Muller, S., & Bauda, P. (1996). A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties, 142, 27–30.
- Goodpaster, T., Legesse-Miller, A., Hameed, M. R., Aisner, S. C., Randolph-Habecker, J., & Coller, H. A. (2008). An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56(4), 347–358. <https://doi.org/10.1369/jhc.7A7287.2007>
- Gulati, M., Nobile, C. J., & Biology, C. (2017). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*, 18(5), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
- Haapasalo, M., Shen, Y., Qian, W., & Gao, Y. (2010). Irrigation in Endodontics. *Dental Clinics of North America*, 54(2), 291–312. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2009.12.001>
- Illperuma, R. P., Park, Y. J., Kim, J. M., Bae, J. Y., Che, Z. M., Son, H. K., ... Kim, J. (2011). Immortalized gingival fibroblasts as a cytotoxicity test model for dental materials. *J Mater Sci: Mater Med*. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4473-6>
- Kishen, A., & Haapasalo, M. (2012). Biofilm models and methods of biofilm assessment Introduction : changing paradigm in, 58–78.
- Knezovic, M., & Ivanis, A. (2017). Efficacy of Three Different Lasers on

- Eradication of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, XX(Xx), 1–6. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4258>
- Kuru, L., Parkar, M. H., Griffiths, G. S., Newman, H. N., & Olsen, I. (1998). Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. *Journal of Dental Research*, 77(4), 555–564. <https://doi.org/10.1177/00220345980770040801>
- Metzger, Z., Solomonov, M., & Kfir, A. (2013). The role of mechanical instrumentation in the cleaning of root canals. *Endodontic Topics*, 29(1), 87–109. <https://doi.org/10.1111/etp.12048>
- Padrón, K., Salmen, S., Berrueta, L., González, E., Dávila, L., Rojas, J., & Sosa, L. (2012). Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal (Gingival fibroblast purification from oral mucose tissue) Resumen Introducción, 1(1), 4–8.
- Park, E., Shen, Y. a, & Haapasalo, M. (2013). Irrigation of the apical root canal. *Endodontic Topics*, (6), 54–73. <https://doi.org/10.1111/etp.12028>
- Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
- Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A., & Mitry, R. R. (2012). Introduction to Cell Culture. In *Human Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 806, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7>
- Pilizota, T., & Shaevitz, J. W. (2013). Plasmolysis and cell shape depend on solute outer-membrane permeability during hyperosmotic shock in *E. coli*. *Biophysical Journal*, 104(12), 2733–2742. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.011>
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Colorimetric Proliferation Assays. In *Cell Viability Assays: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1601, pp. 1–17). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9>
- Sedgley, C. M., Lennan, S. L., & Appelbe, O. K. (2005). Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *International Endodontic Journal*, 735–742.
- Sedgley, C., Nagel, A., Dahlén, G., & Reit, C. (2006). Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction and Culture Analyses of *Enterococcus faecalis* in Root Canals, 32(3), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.037>

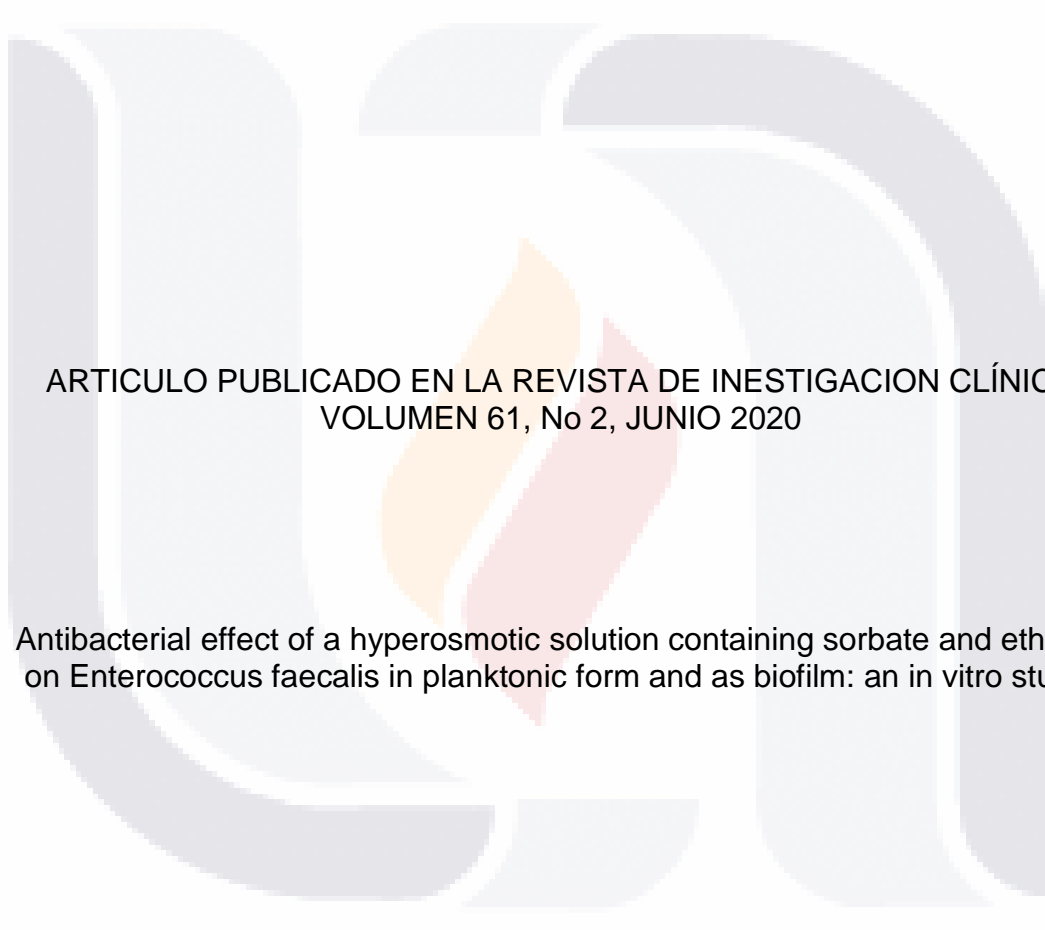
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2008). Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *Journal of Endodontics*, *34*(11).
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.07.028>
- Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). Enterococcus faecalis : Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment, *32*(2), 93–98.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>
- Tartari, T., Bachmann, L., Garcia, A., Maliza, A., Andrade, F. B. De, Duarte, A. H., ... Zhuh, J. S. (2016). Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. *J Appl Oral Sci*, *24*(3), 291–298.
- Van der Waal, S. V., Van der Sluis, L. W. M., Özok, a. R., Exterkate, R. a M., Van Marle, J., Wesselink, P. R., & De Soet, J. J. (2011). The effects of hyperosmosis or high pH on a dual-species biofilm of Enterococcus faecalis and Pseudomonas aeruginosa: An in vitro study. *International Endodontic Journal*, *44*(12), 1110–1117.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01929.x>
- Van der Waal, S V., Scheres, N., de Soet, J. J., Wesselink, P. R., & Crielaard, W. (2014). Cytotoxicity, interaction with dentine and efficacy on multispecies biofilms of a modified salt solution intended for endodontic disinfection in a new in vitro biofilm model. *International Endodontic Journal*, 153–161.
<https://doi.org/10.1111/iej.12294>
- Van der Waal, Suzette V., Jiang, L. M., de Soet, J. J., van der Sluis, L. W. M., Wesselink, P. R., & Crielaard, W. (2012). Sodium chloride and potassium sorbate: A synergistic combination against Enterococcus faecalis biofilms: An in vitro study. *European Journal of Oral Sciences*, *120*(5), 452–457. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2012.00982.x>
- Wijnker, J. J., Koop, G., & Lipman, L. J. a. (2006). Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology*, *23*(7), 657–662.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.11.004>
- Wright, P. P., Kahler, B., & Walsh, L. J. (2017). Alkaline Sodium Hypochlorite Irrigant and Its Chemical Interactions. *Materials*, *10*, 1–8. <https://doi.org/10.3390/ma10101147>
- Yao, T. (2017). Animal-cell culture media : History, characteristics, and current issues, (January), 99–117.

<https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>

Zhua Wan-chun, Gyamfi Jaqueline, Niu Li-na, Schoeffel John, Liu Si-ying, Santarcangelo Filippo, Khan Sara, Tay Kelvin, Pashley David, T. F. (2013). Anatomy of Sodium Hypochlorite Accidents Involving Facial Ecchymosis – A Review. *J Dent*, 41(11), 1–24.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.08.012.Anatomy>



ANEXO



ARTICULO PUBLICADO EN LA REVISTA DE INVESTIGACION CLÍNICA
VOLUMEN 61, No 2, JUNIO 2020

Antibacterial effect of a hyperosmotic solution containing sorbate and ethanol on *Enterococcus faecalis* in planktonic form and as biofilm: an in vitro study.

Antibacterial effect of a hyperosmotic solution containing sorbate and ethanol on *E. faecalis* in planktonic form and as biofilm: an *in vitro* study.

Mónica Elisabeth Rojas Briones¹, Ricardo Oliva Rodríguez², Omar González Ortega², Ana María González Amaro², Jairo Mariel Cárdenas², Francisco Javier Avelar González² and Alma Lilián Guerrero Barrera²

¹Endodontics Postgraduate Program, Faculty of Dentistry, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí, SLP, México.

²Laboratory of Bioseparations, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí, SLP, México.

³Laboratory of Cell and Tisular Biology, Basic Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, México.

Key words: biofilm; hyperosmolarity; *E. faecalis*; irrigant; endodontics.

Abstract. The antibacterial effect of a hyperosmotic solution containing sorbate and ethanol on *E. faecalis* in planktonic state and in biofilm was evaluated. Three hyperosmotic solutions (HS-A, HS-B y HS-C) were obtained from different formulations of potassium sorbate and sodium chloride, which were tested as antimicrobials against planktonic forms of *E. faecalis*, in McFarland standards from 0.5 to 7, using the sedimentation technique and colony forming units (CFU) count. Afterwards an *E. faecalis* biofilm was produced in the palatal roots of upper first molars, by a static method in 21 days; subsequently they were prepared biomechanically by the Universal Protaper system, using the hyperosmotic solution B as an irrigant to evaluate the bacterial load reduction. One pre-instrumentation sample and one post-instrumentation sample were taken, and then were processed and cultivated to count CFU. Consecutively, roots were observed by scanning electron microscopy. The hyperosmotic solution had an important antibacterial effect when used against *E. faecalis* in planktonic state; solutions HS-A and HS-B were effective in eliminating *E. faecalis* up to 7 McFarland, while a statistical difference ($p < 0.001$) was observed in reducing the bacterial load in the biofilm, based on the \log_{10} CFU count. The final solution tested seemed not to harm the dentinal structure and was capable of causing morphological changes to the bacterial cell consistent with a hyperosmotic shock. Thus, the solutions tested could be an option to be considered as irrigating agents; nonetheless further research is required regarding its biocompatibility.

Corresponding author: Alma Lilián Guerrero Barrera. Laboratory of Cell and Tisular Biology, Basic Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, México. Blvd Universidad N° 940, Cd. Universitaria, Zip Code 20100, Aguascalientes, Ags. Mexico. Phone: +52 (449) 1960192. Email: alguerre@correo.uas.mx
