

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO DE ORTODONCIA**



TESIS

“Propiedades antimicrobianas y cito-toxicidad de las nano-partículas de plata depositadas en placas de titanio *-In vitro*”.

Tesista:

Martha Alicia Laredo Naranjo.

MEDICO ESTOMATOLOGO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

2011

Como requisito parcial para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias Odontológicas con Orientación en Ortodoncia.

AGOSTO DE 2014



ASESORES:

DIRECTOR DE TESIS

CD. PHD ESPECIALISTA EN ORTODONCIA Roberto Carrillo González.

CO-DIRECTOR DE TESIS

CD. MC. PHD. Roberto Carrillo Fuentesvilla.

ASESORA METODOLÓGICA

CD. PHD. Posgraduada en Ortodoncia M.C. Hilda H.H. Torre Martínez.

ASESOR EXTERNO

CD. MC. PHD. Myriam Angélica de la Garza Ramos.

PHD Marco Antonio Garza Navarro

CD. MC. Casiano del Ángel Mosqueda.

ASESOR ESTADÍSTICO

LFM. MC. PHD. Roberto Mercado Hernández

COORDINADOR DEL POSGRADO DE ORTODONCIA

C.D. Especialista en Ortodoncia Roberto Carrillo González PHD.

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

C.D.M.E.O. Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda PHD.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Los miembros del jurado aceptamos la investigación y aprobamos el documento que avala a la misma, que como opción a obtener el grado de Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Ortodoncia presenta la Medico Estomatólogo Martha Alicia Laredo Naranjo

Honorables Miembros del Jurado:

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por el regalo de vivir, por ser el motor que me impulsa, la luz en mi oscuridad , por ser mi camino, mi guía, por permitirme llegar a este día con salud y vivir esta hermosa experiencia llena de inolvidables momentos, aprendizajes, y crecimiento en todos los aspectos de mi vida; por ser mi fortaleza en los momentos difíciles y por su inmenso amor que ha hecho posible todos los éxitos en mi vida, este es uno más y se lo dedico con todo mi corazón.

Mami mi angel guardian, mi más grande amiga, complice, confidente, consejera, mi mayor inspiración y ejemplo a seguir, la mejor mujer y madre. Gracias a ti por darme la vida, cuidarme, educarme, alimentar mis sueños, apoyarme incondicionalmente, y por tu comprensión a lo largo de todos estos años, por estar a mi lado y jamas soltarme de tus brazos, por levantarme en mis tropiezos y motivarme a intentarlo una vez más, enseñándome que de cada experiencia buena o mala siempre será optima lo importante es aprender y nunca perder la fe en uno mismo. Sin ti esto no seria posible. Lo que hoy soy te lo debo a ti, a cada uno de los sacrificios te quiero tanto.

Papá mi protector por excelencia y guía , este logro sin duda no hubiera sido posible sin ti gracias por motivarme siempre a dar más del 100% a no conformarme, y siempre superarme por creer en mi, tenerme paciencia, por tu amor y comprensión durante estos años es un logro más tuyo papa.

Carolina, mi conciencia.. no tengo palabras para agradecerte todo. Gracias por iluminar mi estancia en Monterrey durante estos 3 años realmente no hubiera sido posible este logro sin tu compañía, paciencia, aliento y sinceridad en todo momento, gracias por no dejarme caer nunca, por hacer mi mundo más ligero y hacer lo imposible posible te amo.

Ruben, gracias por apoyarme siempre, por tus consejos, risas y creer en mi en todo momento, te quiero Mucho hermano.

Goofy, gracias porque la amistad que tu y yo compartimos durante todos estos años , llena por completo el gran vacio que me dejaste, estas y estaras siempre en mi corazón lo logramos amigo y tu eres parte de esto.

Gracias a cada uno de ustedes Mi familia por estar siempre a mi lado, dándole sentido a mi vida, aprecio su sacrificio son el regalo mas grande que dios me dio los amo y les dedico este éxito.

Dr. Rea y Dr. Raul Rosales Ibañes no tengo palabras para agradecer su apoyo siempre, su energía positiva, sus consejos y por brindarme la oportunidad de vivir la experiencia de la investigación al lado de personas tan brillantes y preparadas como ustedes fue un honor, los admiro y los quiero mucho.

Mis amigas Jazmin, Nelly, Nora, Tania como los cinco dedos de la mano, siempre unidas, las amo, Gracias por su amistad.

Mis hermanas de vida durante estos tres años de posgrado Daniela, Adriana, Sofia, Marienkys, Rosalba, Yadira, gracias por crecer junto conmigo, por su amistad, ocupan un lugar especial en mi corazón. Llego el momento de que cada una emprenda su camino por lo que hemos vivido juntas las quiero, siempre las llevare en mi mente y corazón sin importar la distancia.

Delia y Many amigas muchas gracias por abrirme sus corazones, por su apoyo y ayuda incondicional en tiempos difíciles, que el lazo de amistad que hemos construido, perdura por siempre. Creo que dios jamas se equivoca al poner a las personas en nuestra vida en el lugar y tiempo justos, gracias porque juntas crecimos y por demostrarme que también en los momentos difíciles, diosito me premia con amigas como ustedes. Las quiero mucho.

Gracias a todas las personas que de alguna manera colaboraron en la realización de este proyecto, sin su ayuda no hubiese sido posible de manera especial agradezco al Dr. Roberto Carrillo González, Dr. Roberto Carrillo Fuentes, Dr. Marco Garza, Dra. Myriam de la Garza Ramos, Dra. Hilda Torre Martinez, Dr. Roberto Mercado, Dr. Casiano del Ángel Mosqueda.

Dr. Roberto Carrillo Fuentes gracias por todas las atenciones que siempre tuvo usted conmigo, por las molestias que le di por mi tesis, por su paciencia, y disponibilidad de enseñanza sin reservas, por exigirme ser mejor cada dia en mi trabajo muchas gracias lo aprecio mucho, un honor que sea mi director de tesis.

Dra Hilda y Dr. Pedro Menchaca, Gracias por su paciencia para enseñarme, por compartir conmigo toda su experiencia muchas gracias a los dos los quiero mucho.

No tengo palabras para agradecer a todos y cada uno de mis maestros e instructores de clínica, sin excluir a ninguno, Gracias Totales por el tiempo que compartieron conmigo, por su experiencia, paciencia a ustedes les debo mi formación profesional y me llevo un pedacito de cada uno de ustedes. Por siempre mi respeto, admiración y un lugar privilegiado en mi corazón.

INDICE

CAPITULO	PAG.
1 RESUMEN	9
2 INTRODUCCIÓN	10
3 ANTECEDENTES	13
3.1.-Mini-implantes dentales	14
3.2.-Osteointegración y el Fracaso de implantes	16
3.3.-Peri-implantitis en implantes dentales	18
3.4.-Formación del Biofilm	20
3.5.-Composición de la microflora en los sitios de los implantes dentales	21
3.6.- <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
3.7.- <i>Streptococcus mutans</i>	27
3.8.- Clorhexidina	28
3.9.- Clorhexidina sobre el tejido peri-implantario	29
3.10.-Acción Antimicrobiana de la Clorhexidina	30
3.11.- Citotoxicidad de la Clorhexidina	31
3.12.-Nanotecnología	32
3.13.-Nano partículas de Plata	33
3.14.-Toxicidad de la nanotecnología	39
3.15.-Efectos de las nanopartículas de plata su citotoxicidad, propiedades antimicrobianas, sobre implantes dentales	41
3.16.- Microbiología implantes	44
3.17.- Nanopartículas de plata efecto antimicrobiano	45
3.18.- Deposición de Nanopartículas de plata en materiales	47
3.19.- Citotoxicidad	50

4	HIPOTESIS	51
5	OBJETIVOS	53
6	MATERIALES Y METODOS	55
6.1.	Población	55
6.2.	Criterios de Inclusión y Eliminación	56
6.3.	Captación de Variables	57
6.4.	Descripcion de Procedimientos	57
6.5.	Método Estadístico	63
DISEÑO ESTADISTICO		
7	RESULTADOS	67
8	DISCUSIÓN	73
9	CONCLUSIONES	82
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	85
11	ANEXOS	93
11.1.	Anexo 1 (Figuras)	94
11.2	Anexo 2 (Tablas)	99

Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Odontología
Subdirección de Estudios de Posgrado
Posgrado de Ortodoncia
M.E. Martha Alicia Laredo Naranjo.
Candidato a: Maestría en Ciencias Odontológicas con Orientación en Ortodoncia
“Propiedades antimicrobianas y cito-toxicidad de las nano-partículas de plata depositadas en placas de titanio -In vitro”

No. de páginas:

I. RESUMEN

Introducción: La colonización microbiana y la formación de placa en la superficie del mini-implante de ortodoncia causa periimplantitis y conduce en algunos casos a la pérdida de hueso así como movilidad en el mini-implante. Objetivo: establecer el efecto antimicrobiano *in vitro* de las nano partículas de plata a distintas concentraciones impregnadas en las placas de titanio con diferentes cepas bacterianas. Así como determinar la citotoxicidad *in vitro* de las nano partículas de plata en las placas de titanio (Ti-NAG).

Materiales y Métodos: Para las pruebas antimicrobianas, se impregnaron nano partículas de plata (NAG) en tres concentraciones distintas (16%) (50%) (100%) a las placas de titanio, se sembraron cultivos, usando las siguientes cepas bacterianas de *Streptococo mutans*, *Porphyromona gingivalis*. Se realizo una prueba de citotoxicidad usando el método de fluorescencia Glomax- Multi Detection System de esta forma se evaluó la viabilidad celular en células mesenquimales de pulpa dental, Tras el uso de NAG. Dichos experimentos se realizaron por triplicando usando como control positivo la Clorhexidina al 0.12%. Las Pruebas estadísticas que se usarón fue un ANOVA y prueba de Tukey donde el valor ($p < 0.01$) era considerado estadísticamente significativos. Se aplico prueba *t* de Student ($p \geq 0,05$) siendo estadísticamente significativo para las pruebas antimicrobianas.

Resultados: Las Nano partículas de plata en todas sus concentraciones son antimicrobianas, presentándose un mayor efecto microbiano dependiente de la concentración es decir a mayor concentración mayor actividad antimicrobiana, teniendo un mayor efecto inhibitorio sobre *Porphyromona Gingivalis* a comparación de *Streptococo Mutans*, sin embargo no es comparable con el poder antimicrobiano de la Clorhexidina al 0.12%. De igual manera las NAG son significativamente más citotóxicas al 50 % y 100% teniendo una viabilidad celular del 4% mientras que el 16% de las NAG presentaba una viabilidad del 95% de sus células, siendo estadísticamente menos citotóxico en comparación de la Clorhexidina al 0.12% que tenía una viabilidad celular del 62%.

Conclusión: Los resultados satisfactorios de este estudio hacen ver que las nanopartículas de plata tienen propiedades antimicrobianas, así como una alta viabilidad celular a una concentración del 16%, siendo menos tóxica que la clorhexidina, lo que hace pensar que la deposición de ellas, puede llegar a ser una buena opción de revestimiento, obteniendo materiales no tóxicos capaces de tener una liberación dirigida y sostenida de plata bactericida en el lugar de implantación, sin embargo se requiere de mayor investigación

Palabras clave: nano partículas de plata, titanio, actividad antibacteriana, citocompatibilidad, mini-implantes, clorhexidina, Ortodoncia
Director de Tesis : C.D. M.L. CD. PHD Roberto Carrillo González.

Introducción

2 INTRODUCCIÓN

La ortodoncia actual utiliza de manera frecuente como parte del plan de tratamiento la colocación de los mini-implantes de titanio, con el objetivo de obtener y/o mejorar el anclaje esquelético durante el mismo y con ello reducir la cooperación del paciente.

La colocación de un mini-implante es un tratamiento sencillo, pero en el que, la inflamación del tejido peri-implantario y la contaminación por microorganismos, son factores asociados con la movilidad del mini-implante y, por lo tanto, de su fracaso como técnica de anclaje.

Debido a ello se considero importante llevar a cabo esta investigación, la cual pretende mediante el uso de nanopartículas de plata depositadas en una superficie de titanio, que es el mismo material que representa a los mini-implantes, poder evaluar los efectos antimicrobianos y observar los efectos citotóxicos *in-vitro* de estas nanopartículas de plata impregnadas en dichas placas de titanio.

Al conocer estas propiedades, se podrá aportar una solución para aumentar la fibrointegración de los mini-implantes dentales en los tratamientos ortodónticos, dado que uno de los fracasos más comunes de los mini-implantes dentales, es la acumulación temprana o tardía de placa dento-bacteriana. Esta acumulación provoca, en el mayor de los casos, episodios de peri-implantitis, migración y destrucción de los tejidos adyacentes del mini-implante, gracias a una inflamación y a la infección bacteriana, pudiendo inducir esto al fallo total del mini-implante.

Al reunir estos datos *in vitro*, es decir, la reducción de la tasa de colonizaciones bacterianas como el no tener efectos citotóxicos, forman parte de dos criterios necesarios e importantes para la aplicación clínica de las nanopartículas de plata

a los mini-implantes dentales; permitiendo una mejor calidad en los tratamientos ortodónticos, aumentando la tasa de éxito y logrando los resultados deseados del tratamiento. Con este fin, se ha depositado a la superficie de una placa de titanio la solución que contiene las nanopartículas de plata.

La hipótesis planteada y que fue aceptada en este estudio fue que la deposición de nanopartículas de plata, en la superficie de las placas de titanio, exhiben propiedades antimicrobianas contra *Streptococo mutans* y *Porphyromona gingivalis* y baja citotoxicidad.

Esta Investigación consistió en un estudio *in vitro* prospectivo, experimental, longitudinal, y comparativo, abierto en el cual se tuvo como objetivos, el establecer el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata en las placas de titanio *in vitro* con la cepa bacteriana *Streptococo mutans* (Au159 ATCC17040), y *Porphyromona gingivalis* (Pg. W50). Así como determinar la citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas de plata y comparar las respuestas de las nanopartículas de plata a distintas concentraciones en las pruebas antimicrobianas y de citotoxicidad.

Evaluando las propiedades antimicrobianas y de citotoxicidad *in-vitro* de las nanopartículas de plata adheridas a las superficies de las placas de titanio.

Antecedentes

3 ANTECEDENTES

3.1.-Mini-implantes

En ortodoncia el control del anclaje es uno de los factores más importantes en el éxito del tratamiento. Se han desarrollado diferentes métodos de anclaje que incluyen el anclaje intra-oral o bien el extra-oral. No obstante, la desventaja de este último es que no provoca un control de anclaje adecuado sin la cooperación del paciente, sin embargo, los aparatos intra-orales muestran algunos, una pérdida de anclaje.

Al usar los mini-implantes como anclaje esquelético se puede esperar un buen control de él, sin que se queje el paciente (Hyo Sang y col 2006); siendo ampliamente utilizados en el tratamiento de ortodoncia. Este procedimiento se define como la resistencia de los dientes posteriores hacia el movimiento mesial, el cual proporciona anclaje en el área de los molares para lograr junto con la ortodoncia, la retracción simultánea del segmento anterior maxilar. Estos mini-implantes de fijación maxilar, están compuestos de titanio comercialmente puro, bioinerte (Ti6Al4V), que se ha utilizado ampliamente como un biomaterial implantable, dado que tiene una excelente resistencia a la corrosión además de una buena bio-compatibilidad (Rodríguez, Casasa, 2004).

Existen varios tamaños de implantes. Los mini-implantes para ortodoncia miden por lo regular 6mm de largo por 1.2 de diámetro. Si su uso es como implantes dentales estándares miden 6 y 15 mm de largo y 3-5 mm de diámetro. La forma más comúnmente usada es la cilíndrica- cónica con superficie lisa o tratada. (Jae Cho y Col 2006).

Los materiales más comúnmente utilizados pueden dividirse en 3 categorías: Biotolerantes (acero inoxidable y aleación de cromo-cobalto); bioinerte (titanio, carbón); y bioactivo (hidroxiapatita, óxido de aluminio), (Tat-Chi Leung 2008). Por sus características, del titanio (no provoca alergia, reacciones inmunológicas y no formador de neoplasias) es considerado el material ideal y ampliamente

utilizado, proporcionando excelentes propiedades de biocompatibilidad. Dichos Mini-implantes presentan una elevada tasa de éxito en los tratamientos ortodónticos, por la superioridad como fuente de anclaje esquelético, por las pocas limitaciones anatómicas, su colocación simple, con carga inmediata y su periodo curativo corto, así como su versatilidad en aplicaciones, Por todo ello se considera que los mini-implantes son muy rentables actualmente (Ya Chen Hee y col, 2009).

A pesar de su gran éxito en la facilitación de los resultados del tratamiento, las tasas de los fallos son ampliamente variables. La falta de estabilidad primaria tiende a causar que los mini implantes se vuelvan progresivamente más móviles hasta que falle el tratamiento. Otras complicaciones de los implantes dentales son las debidas a la acumulación de la placa dento-bacteriana, por una deficiente higiene dental; la cual provoca una falta de fibrointegración del tejido blando con el implante. De esta manera ocurre la pérdida del sellado biológico, dando lugar al fracaso del implante dental (Karthikeyan y Col 2009).

En estudios se a observado que durante el estadio de carga de los implantes dentales, existe una absorción de una película de saliva y por lo tanto, una subsecuente acumulación bacteriana produciendo este biofilm, induciendo con ello a una respuesta inflamatoria.

Tanto la cantidad como la calidad de la adhesión de esta placa en la superficie del implante son importantes en el éxito a largo plazo del implante dental. La formación de este biofilm está influenciada por las características de la superficie, por su aspereza y su composición química de los implantes, siendo así que estos factores juegan un papel importante en la adhesión bacteriana (Karthikeyan S y col, 2009).

Las superficies ásperas facilitan la colonización bacteriana y la formación del biofilm, como lo dice Karthikeyan, en su estudio en el 2009 en donde muestra que varios autores, afirman que la rugosidad o bien la aspereza de la superficie del implante albergan menor cantidad de microorganismos cocos supragingivales, los cuales son indicadores de una placa mucho más madura;

mientras que subgingivalmente, albergan 25 veces más bacterias, en donde existe una menor cantidad de cocos.

Por lo anterior se infiere que los materiales que no previenen la formación del biofilm no son una buena opción para la fabricación de un implante, dado que el diseño y las características de su superficie, juegan un papel muy importante en la colonización temprana bacteriana de la formación del biofilm (Karthikeyan S. y col, 2009).

Es por eso que los mini-implantes son una poderosa ayuda para el ortodoncista en la resolución de las maloclusiones difíciles, pero el fracaso de estos micro-implantes puede retrasar el tiempo del tratamiento.

3.2.-Osteointegración y el Fracaso de implantes

Después de que el implante endo-óseo es insertado al hueso existe un proceso de osteointegración, el cual es considerado como la conexión directa estructural y funcional entre el hueso vital y la superficie de titanio del implante. Así la superficie de óxido de titanio del implante alcanza una unión con la encía superficial, restringiendo el ingreso de microorganismos orales (Pye AD y col, 2009).

Otros autores definen la osteointegración como el proceso en el cual se alcanza, una fijación rígida asintomática del material aloplástico manteniendo el nivel óseo durante la carga funcional (Esposito M. y Col, 1998).

Ahora bien, cuando esta osteointegración no se alcanza, provoca fracasos en el implante. Algunos de estos fracasos están basados en las contemplaciones mecánicas como la distribución de fuerzas, la carga, el estrés físico, las propiedades del material, el diseño del implante, las técnicas quirúrgicas, estos son factores que pueden influir significativamente en la falla del implante (A. Mombelli 1993).

Otro de los riesgos de las fallas de los implantes incluyen no solo una técnica no adecuada, sino ciertos factores atribuibles al huésped, como el fumar y otros hábitos parafuncionales (Ya Chen y Col, 2009). Asimismo, su fracaso está

asociado a la flora microbiana, tradicionalmente relacionada a la periodontitis, observándose un cambio de una composición Gram positiva, no móvil aerobia y facultativa anaerobia, hacia una flora con gran proporción de Gram negativos, móviles anaerobia (Pye AD, y Col, 2009).

Esposito en 1998 afirmó, que las fallas del implante son cuatro; las fallas biológicas, mecánicas, iatrogénicas, y las inadecuadas o con insuficiente adaptación del paciente. Mientras que Pye AD, y colaboradores en el 2009 clasifica en su estudio, algunos factores que se relacionan al fracaso de los implantes dentales entre ellos cita los siguientes factores;

- Los sistémicos del paciente; fumar, alcoholismo, edad, obesidad, enfermedades sistémicas entre otros.
- Del ambiente y técnicas quirúrgicas; trauma quirúrgico, contaminación en la operación.
- Elementos locales del paciente; gingivitis, calidad y cantidad de tejido óseo, estado periodontal del individuo, integridad vascular, etc.
- Mecánicos de carga; la oclusión traumática.
- Propios del implante; como son las propiedades de su superficie.

Por lo anteriormente dicho, el fracaso de los implantes puede ocurrir, ya sea por un primer tiempo donde existe la pérdida prematura del implante cuando éste no haya logrado llegar a osteointegrarse a consecuencia de una pobre estabilidad, de contaminación, hábitos, mala técnica de cepillado, etcétera, y en un segundo tiempo, puede provocarse su pérdida cuando éste ya esté osteointegrado y en función. En esta etapa ya se hablaría de la peri-implantitis en donde existirían dos factores etiológicos importantes, que son la sobrecarga oclusal y la infección bacteriana, o bien una combinación de ambos (Roncero A, 2009) ;(Quinteros B, y col 2000).

En cuanto a los mini-implantes, son varios los factores que afectan su éxito, tales como los que dependen del propio mini-implante, los que recaen sobre el operador y los dependientes del paciente, siendo la higiene bucal el único factor dependiente del paciente. Estos factores pueden indicar, la peri-implantitis dando

lugar así, a la peri-implantitis, la infiltración epitelial, el sangrado al sondeo, supuración, pérdida de soporte óseo, la movilidad y, finalmente, dar como consecuencia el fracaso del mini-implante (Nagarathna KN. y Col,2012). Estas mismas conclusiones, fueron a las que se llegó en un estudio de implantes dentales por Quinteros y colaboradores en el 2000.

Así también, Hyo Sang Park, en su estudio sobre los factores de riesgo de los mini-implantes, analizó 227 mini-tornillos con fines de anclaje ortodóntico, utilizando 4 tipos de mini-implantes de distintos diámetros y longitudes. En este estudio se evaluaron algunos factores, como aquellos del medio ambiente que incluían, higiene oral, inflamación alrededor de los mini-implantes; dando como resultado que el 91.6 % de estos tenían éxito en un periodo de 15 meses; y encontrando también que no existía relación entre el éxito de los mini-implantes con la fuerza aplicada y angulación. En cuanto a los factores ambientales de los mini-implantes encontró que estos, asociados con la inflamación, mostraban un menor éxito, ya que dicha inflamación puede dañar el nivel óseo alrededor del cuello de los mini-implantes, generando un daño progresivo del hueso cortical; y poniendo en peligro la permanencia de los mini-implantes. Esta inflamación puede ser incrementada por la mala higiene oral, y por la existencia de poco tejido no-queratinizado alrededor del mini-implante (Hyo Sang P. y col 2006).

3.3.-Peri-implantitis

De acuerdo a lo descrito anteriormente uno de los factores principales que llevan al fracaso de los mini-implantes usados en ortodoncia son las enfermedades peri-implantarías, las cuales son un conjunto de reacciones inflamatorias en los tejidos suaves alrededor de los implantes, donde existe la Peri-implantitis mucositis; esta se describe como las reacciones reversibles inflamatorias en tejidos blandos alrededor del tejido. Y la Peri-implantitis; que se refiere a reacciones inflamatorias con pérdida ósea, en tejidos alrededor del implante funcional (Esposito M. y col, 1998); (Fransson Christer) ;(Koldslund OC, y col 2010); (Quinteros B. y col, 2000).

El término de peri-implantitis ha sido propuesto como uno de los estados patológicos de osteointegración de los implantes y de los tejidos de alrededor de él, dando un defecto que asume la dimensión a lo largo del implante y es muy bien demarcado.

Este término fue introducido en 1980 para describir el proceso de destrucción inflamatorio, afectando tanto el tejido suave y el duro alrededor de los implantes osteointegrados, que lleva a la formación de una bolsa y a la pérdida del hueso de soporte del implante (A. Mombelli, 2000) ;(Pye AD, y col, 2009).

The Sixth European Workshop en periodoncia describe a la mucositis peri-implantaria como la presencia de inflamación en la mucosa en el lado del implante sin signos de pérdida de soporte óseo (Koldslund OC. y cols. 2010). En 2008, se definió que las enfermedades peri-implantarías van seguidas de la mucositis peri-implantaría, que es la presencia de inflamación en la mucosa cercana al implante sometido a carga sin signos de pérdida ósea de soporte, mientras que la peri-implantitis junto con la suma de la inflamación de la mucosa se caracteriza por la pérdida de soporte óseo.

Esta mucositis peri-implantaría aparece en el 80% de los pacientes y en el 50% de los implantes , mientras que la peri-implantitis se observa en 28% a 56% de los pacientes y en un 12% a 43% de los implantes (Zitzmann NU. y col, 2008).

Mombelli en el año 2000, en su estudio sobre la microbiología de los implantes con y sin pérdida ósea, afirma que la peri-implantitis puede verse como un sitio específico de infección, que produce muchas de las características comunes de la periodontitis crónica (Mombelli ,2000).

Los principales signos de falla del implante se detectan clínicamente y radiográficamente con el diagnóstico similar a la periodontitis, incluyendo los parámetros de medición clínica, el sangrado al sondeo, la presencia de placa bacteriana, cálculo, edema , enrojecimiento de tejidos marginales, hiperplasia de la mucosa en las zonas donde no hay demasiada encía queratinizada, los índices de placa y gingivitis, la supuración, y radiografías con presencia de reabsorción ósea, movilidad del implante, dolor y los muestreos microbiológicos (Pye AD, y col 2009) ;(Roncero A, 2009).

Los tejidos blandos que rodean al implante proporcionan un cierto mecanismo de protección ante los agentes etiológicos de la enfermedad peri-implantaria actuando como una barrera biológica. La pérdida de este sellado mucoso junto con la falta de higiene, proporcionan un medio adecuado para la proliferación de las bacterias que penetran el surco gingival. En este caso las bacterias Gram negativas anaerobias actúan produciendo una mucositis peri-implantaría; y si esto no se trata, derivará en una peri-implantitis, que conlleva a una pérdida ósea y eventual fracaso del implante (Quinteros B, y col, 2000).

Siendo así que la peri-implantitis, es la principal causa de fracaso de los implantes dentales, en él que los cambios inflamatorios de los tejidos blandos alrededor de los implantes orales conducen a una destrucción progresiva del hueso de soporte, ésta se ve hasta en un 43% de los individuos tratados con implante o en los tejidos blandos clasificados como mucositis peri-implantitis, que se detecta hasta en un 50% de los pacientes tratados con implantes (RP Allaker , 2009).

3.4.-Formación del Biofilm

Los biofilms son comunidades de bacterias y otros organismos celulares aislados organizados en un depósito de lodo blando. La formación del biofilm de placa en la cavidad oral es un proceso extenso que empieza con la formación de esta película de saliva que es acelular, seguida de la absorción de bacterias a esta película, requiriendo de adhesinas específicas como la lectina. Esta película, puede ser reversible por las fuerzas mecánicas, mientras que deja de ser reversible con el tiempo ya que involucra más adhesinas en la superficie bacteriana produciendo mayores colonias bacterianas. Este crecimiento va seguido, como resultado, la formación de la placa a la que llamamos biofilm, que se va haciendo más compleja, conforme el tiempo avanza.

La rápida colonización de los microorganismos orales empieza en la superficie dental después de 0 a 4 horas de la formación de la película. Karthikeyan Subramani, en 2009, describió una proporción inicial de colonizadores, como

los *Streptococcus Sanguis*, *Oralis*, *Mitis* así como la especie *Actinomicetecomitans*, las cuales son bacterias gram negativas; y los colonizadores tardíos el *S. mutans* y *S. sobrinus*. Durante las próximas 4 a 24 horas estas bacterias se multiplican y agrupan ciertas micro-colonias, que integran la placa supragingival (Karthikeyan Subramani, y col 2009). Por otro lado, afirma que el exudado crevicular, junto con el líquido gingival crevicular, nutren a las bacterias para dar forma a la placa subgingival. Después de 1 a 14 días, los *Streptococcus*, que predominaban en la placa cambian a una placa dominada por *Actinomyces*, siendo así la sucesión microbiana; y después de 2 a 4 semanas estas bacterias se vuelven más diversas, con mayores niveles de gram negativas anaerobias. Esto resulta en una placa más madura, a la que ya se le puede nombrar biofilm. Esta placa supragingival es la causante de la gingivitis; de esta puede proseguir a una periodontitis, sumado a bacterias subgingivales como, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* (Karthikeyan Subramani. y col, 2009).

Siendo así que la presencia de bacterias patógenas y la formación de la placa dentó-bacteriana sobre la superficie, esta relacionada con la adhesión de ciertas especies que actúan como pioneras y se adhieren directamente a dichas superficies, algunas especies que incluyen *Streptococcus orales* y *Actinomyces*; de donde los *Streptococcus* representan más del 80% de los colonizadores primarios (Rodríguez Hernández, y col, 2009).

Por lo tanto se concluye que para formar un biofilm, la bacteria primero se adhiere a una superficie y se ajusta al estado de la misma. Si el ambiente es propicio para el crecimiento, la bacteria crecerá en la superficie y se desarrollará dentro de una matriz madura. Para completar el ciclo, la bacteria se disemina y coloniza una nueva superficie. Sin embargo, los estudios demuestran que la nutrición juega un papel crítico en el desarrollo de biofilm. Se ha encontrado que hay varios factores que afectan el desarrollo de biofilms, entre los cuales están; osmolaridad, pH, tensión de oxígeno y temperatura.

3.5.-Composición de la microflora en los sitios de los implantes dentales

Una de las causas de la periimplantitis, como se ha mencionado anteriormente es la colonización bacteriana de la bolsa peri-implantaria ,ya que los implantes dentales son sustratos adecuados para la colonización microbiana y la formación de bio-películas, que es una complicación recurrente en la cirugía de implantes. Por lo que la colonización microbiana de la superficie del mini-implante está siempre precedida de la adsorción de una película adquirida, donde los componentes principales provienen de la saliva y el exudado gingival (Liao, Zhu ,2010).

La adhesión inicial sobre el sustrato se realiza por unas cepas bacterianas concretas, conocidas como bacterias pioneras o colonizadores primarios . Las bacterias inicialmente adheridas proliferan hasta formar una monocapa, sobre la cual se adherirán otras cepas bacterianas. Las bacterias pioneras, que se encuentran dentro del biofilm de la placa supragingival incluyen *Streptococcus oralis* , *Streptococcus sanguinis* , y *Streptococcus mitis*, (Karthikeyan y Col 2009) y los colonizadores tardíos incluyen *Actinobacillus aggregatibacter* , *Prevotella intermedia* , *Denticola Treponema* y *Porphyromonas gingivalis*. (RP Allaker, 2009)

Los biofilms sobre las superficies de los implantes dentales, son la causa de dicha peri-implantitis, que es una de las condiciones que nos lleva al fracaso de los implantes dentales. Los estadios que llevan a la formación del biofilm en los dientes son muy similares a la colonización, que ocurre en los implantes dentales. Las bacterias que colonizan estos últimos incluyen las mismas especies que se encuentran, en la encía sana y en presencia de gingivitis (Karthikeyan Subramani y col, 2009)

El estudio de Mombelli sobre la microflora es interesante, dado que muestra la diferencia que existe entre la flora bacteriana de los implantes con éxito y con pérdida ósea, diciendo así que en los implantes con buena osteointegración se encuentran colonizados principalmente por cocos gram positivos facultativos. Estos se establecen al poco tiempo de la implantación, y contienen pequeñas

cantidades de bacterias anaerobias, mientras que los implantes con características de pérdida ósea y formación de bolsas tienen una flora distinta, prevaleciendo en el 41% bacilos gram negativos anaerobios. De estos existen altos niveles de *Fusobacterium spp*, y *Prevotella intermedia* (A. Mombelli 1993). Mientras que Leonhardt encontró *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella Intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Actinomyces comitans* en un 60% de los sujetos con peri-implantitis (Fransson Christer 2009) (Leonhardt et al 1999).

Con lo que coincide de igual manera, Schou S, y colaboradores en 1992, mencionando que la microbiota subgingival asociada con implantes osteointegrados rodeados por tejidos sanos, o bien con ligera inflamación marginal, es similar a los dientes con una encía sana, mientras que se puede encontrar una microflora más compleja, compuesta principalmente por bacilos Gram negativos anaerobios, con cierta similitud con la enfermedad periodontal en los implantes afectados, mostrando presencia de inflamación marginal y pérdida ósea (Schou S. y col 1992). Es decir, en los implantes con bolsas que no exceden los 5mm predominan cocos, mientras que los implantes con una avanzada formación de bolsas muestra mayores niveles de espiroquetas (A. Mombelli, 2000)(A. Mombelli, 1993).

Por lo que se sugiere que la periimplantitis tiene un proceso de enfermedad específico con la asociación de microorganismos, similar a los conocidos de la periodontitis crónica en los dientes naturales, con predominio de bacilos Gram negativos como *Porphyromonas Gingivalis* y *Prevotella Intermedia*, así como cocos anaerobios Gram negativos como *Streptococcus Veionella* y *Espiroquetas* (Pye AD. y col, 2009); (A. Mombelli, 2000); (Fransson Christer 2009), (Schou S. y col, 1992);(Quinteros B. y col 2000).

Con lo anterior se concluye que la composición del biofilm en las superficies del implante se muestran más complejas con el tiempo. A este respecto, George y colaboradores evaluaron el estado microbiano en la placa submucosa en implantes presentes durante 4 años. Este estudio reveló que había una mayor colonización de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* a comparación de implantes con menor tiempo en boca; mientras que el estudio hecho por

Augthum y Conrads, concluyó que implantes con una función de 6 años mostraban la presencia de bolsas de más de 6 mm. Esto sugirió la presencia de una flora de bacterias Gram negativas anaerobias principalmente colonizadas por *Aggregabacter Actinomycetecomitans*, *Fusobacterium Nucleatum*, entre otras (Fransson Christer, 2009); (George ,1994); (Augthum,1997).

De acuerdo a otros reportes, se muestra un aumento representativo de *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *P Intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, bacterias Gram negativas anaerobias, que se asocian al fracaso de los implantes; mientras que en pacientes edéntulos, se reporta una colonización, de *P. gingivalis*, *P.intermedia* y *F. nucleatum* que son bacterias periodontales, después de 14 a 28 días (A. Mombelli,2000). Como lo indicó Mombelli, la microflora en la cavidad oral, antes de la implantación determina la composición del establecimiento de la microflora en los implantes.

Por lo tanto la peri-implantitis, está asociada en la mayoría de los casos con una flora anaerobia mixta la cual se manifiesta con bacterias representativas como *Fusobacterium Spp*, *P intermedia* en grandes niveles (A. Mombelli 2000). Así también está representada por la presencia de colonizadores no patológicos, es decir cocos Gram positivos presentes en la mucosa peri-implantaría que no denotan signos de inflamación y permiten la penetración de la sonda a no mas de 3mm, dichas zonas muestran pocos riegos de presentar peri-implantitis.

Quinteros y colaboradores realizaron cultivos para observar la microbiota en 16 implantes con peri-implantitis, observando que los especímenes más asociados eran *Stomatococcus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella Oralis* y *Peptostreptococcus* , concordando estos hallazgos con otros estudios, encontrando una presencia preferentemente de bacilos anaerobios, Gram negativos y cocos Gram positivos anaerobios facultativos (Quinteros B.y col, 2000).

Ata-Ali en su revisión bibliográfica de la microbiota asociada a implantes dentales en pacientes sanos y con presencia de peri-implantitis, reporto que el biofilm inicial encontrado entre la superficie de los implantes a la cavidad oral

cuenta con microorganismos iniciales como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus oralis*. Dichas bacterias, crean las condiciones ideales de adhesión de microorganismos patógenos periodontales que provocan la peri-implantitis. Asimismo, observo que en los implantes dentales sanos con ausencia de peri-implantitis, los autores mencionaban, la presencia de una gran proporción de cocos, con niveles bajos de anaerobios, aerobios y una pequeña proporción de Gram negativos con poca presencia de bacterias asociadas a la peri-implantitis, siendo que la *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella*, *Forsythia* y la *Prevotella intermedia* se encuentran en ambos grupos tanto en pacientes sanos como en pacientes enfermos, con diferentes proporciones. Mientras que en pacientes con periimplantitis los autores concluyen que, el *Aggregatibacter actinomycetecomytans* y *Porphyromonas gingivalis* son predominantes en la destrucción peri-implantaria (Ata-Ali J. y col, 2011).

Otros estudios realizados en implantes dentales de distintos materiales expuestos al medio bucal muestran que el *Streptococo*, fue una bacteria colonizadora inicial predominante, después de 4 horas y que los anaerobios incrementaba a las 48 horas, esto se encontró era común en todos los materiales de los implantes estudiados, indicando que las propiedades de los materiales de los implantes influenciaban a la adhesión bacteriana inicial, pero no la maduración de placa (Karthikeyan Subramani, y col 2009).

Estos colonizadores iniciales, *Streptococos* y los *Actinomyces*, son capaces de proporcionar un ambiente favorable para los colonizadores tardíos que requieren condiciones más demandantes. Los patógenos periodontales como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga* y *Fusobacterium* están ligados a los *Streptococos* (Karthikeyan Subramani y col, 2009). Este conjunto de bacterias son las responsables de las infecciones periodontales y de la peri-implantitis, produciendo endotoxinas, que favorecen la respuesta inflamatoria, que da como resultado la pérdida del soporte óseo y del tejido periodontal alrededor del implante. Es por ello la importancia del desarrollo de una

superficie del implante que pueda reducir el número de microorganismos iniciales de esta adhesión.

Algunos estudios expresan la presencia de Gram-positivos alrededor de los implantes, que es significativamente mayor que otras bacterias, siendo el *Streptococcus sanguinis* (RP Allaker, 2009) importante, por ser una de las bacterias que colonizan la superficie del implante inmediatamente después de ser colocado, facilitando la incorporación de otras bacterias periodontopatogénicas. Además, esta cepa se considera como la bacteria más importante de la formación del biofilm y muy asociada con la peri-implantitis. Caracterizándose por pertenecer al grupo de los estreptococos no capsulados que producen hemólisis ; los cocos Gram positivos suelen aislarse en la mucosa oral, placa dentobacteriana, lengua, teniendo unas dimensiones de 1-1,5 μm , con lo que facilita la posterior incorporación de bacterias (Rodríguez Hernández, 2000).

El evitar que los microorganismos se adhieran a las superficies de los dispositivos implantados, es la mejor práctica para la supervivencia de cualquier implante. Sin embargo los implantes infectados y su consecuente desprendimiento es más común en los dispositivos de titanio, por lo cual sigue siendo un reto en la práctica clínica. En las últimas décadas se han desarrollado muchas estrategias para prevenir o reducir la colonización bacteriana de la superficie de titanio, tales como modificaciones en su superficie, como en el pulido.

De lo hasta ahora expuesto se puede concluir, que la microbiota en la cavidad oral antes de la colocación de los implantes osteointegrados va a determinar la composición de la flora bacteriana que se va a formar alrededor de ellos. Existen varios estudios que muestran una relación estrecha entre los microorganismos que colonizan los sitios del implante, con los encontrados en la periodontitis crónica. Así también se observa a través de la revisión bibliográfica que muchos autores coinciden en que, cuando no existe ningún tipo de patología, la flora bucal está compuesta por cocos Gram positivos aerobios y bacilos no móviles, tanto en implantes como en dientes; mientras que en estados patológicos se encuentra una flora distinta, predominando Gram negativos anaerobios, bacilos

móviles, fusiformes y espiroquetas. Entre ellos se encuentra a la *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas gingivalis*, entre otros.

3.6.- Porphyromonas gingivalis

Las bacterias asociadas a la periodontitis, residen tanto en biopelículas que se encuentran por encima y por debajo del margen gingival. Sin embargo, la naturaleza de la biopelícula subgingival es mucho más complicada, dado que existen dos biopelículas diferentes; una asociada a la superficie radicular y otra en íntima relación con la superficie epitelial de la pared blanda de la bolsa. Esta última contiene predominantemente espiroquetas y especies Gram negativas como la *Porphyromona gingivalis*. Esta bacteria es reconocida como el mayor agente causal en el desarrollo y progreso de dicha enfermedad periodontal; así como un patógeno oral oportunista, ya que su habilidad para proliferar y diseminarse en el biofilm subgingival es la parte central de su virulencia.

Se describe a la *Porphyromona gingivalis*, como un bacilo Gram negativo anaerobio, asacarolítico, ampliamente reconocido como un factor predominante en la periodontitis en humanos. En 1992 Socransky estableció los distintos complejos bacterianos, siendo así que las *Porphyromonas gingivalis* prevalecen en el complejo rojo, el cual está muy asociado a la placa subgingival, junto con *T forsythia* y *T denticola*, asociadas con la enfermedad periodontal.

3.7- Streptococcus mutans

Los Streptococcus comprenden un grupo muy diverso de bacterias gram-positivas, que van de un rango patógeno, hasta de iniciación que podría verse envuelto en infecciones oportunistas. En la Cavidad Oral Streptococcus constituyen aproximadamente un 60% del biofilm inicial de la microflora sobre la superficie de los dientes.

El *Streptococcus mutans*, pertenece al complejo Amarillo, siendo un coco Gram positivo anaerobio facultativo, acidófilo, ya que vive en un medio con PH bajo. Esta especie fue descrita por Clark en 1924 a partir de la caries de la dentina, su primer hábitat es la superficie dentaria del hombre, pero también se puede identificar en las fauces. Su presencia en la biopelícula dental se ve muy favorecida por el alto nivel de sacarosa de la dieta (Negróni M, 2009).

3.8.-Clorhexidina

Los agentes quimioterápicos o antisépticos orales, actualmente se consideran un complemento imprescindible en el tratamiento de gingivitis y control de la placa dental. Un Antiséptico ideal tiene que cumplir las siguientes características; 1) amplio espectro antimicrobiano; 2) acción bactericida; 3) largo efecto bactericida; 4) fácil de usar, y 5) menos efectos adversos.

La clorhexidina posee las características antes mencionadas, siendo esta una bisbiguanida positivamente ionizada capaz de absorber diferentes cargas negativas de sitio como: membrana mucosa, película de saliva en los dientes y superficies de titanio, así como de los diferentes componentes del biofilm en la superficie dental, como las bacterias, polisacáridos extracelulares y glicoproteínas; cuya sal más empleada es el gluconato, que se ha incorporado con éxito a colutorios. Su elevada sustantividad le proporciona una eficacia superior a otros compuestos; ya que los compuestos a base de bisbiguanida, son los agentes mas efectivos. (Stoeken 2007). Este catión de clorofenil-bisbiguanida, con propiedades bacteriostáticas extraordinarias, fue sintetizado por primera vez en 1954, después de extensas investigaciones sobre sus propiedades biológicas y componentes polidiguanidicos, fue usado en odontología para la desinfección prequirúrgica y en endodoncia.

Por lo que la clorhexidina ha sido estudiada un par de décadas como un potente agente antimicrobiano usado para el control químico de la placa dentó bacteriana y la prevención de la caries. Debido a sus propiedades, se le a considerado como el producto mas efectivo en el control de la placa supragingival. Sin embargo, uno de los principales efectos secundarios, que

aunque reversibles, son las manchas en los dientes, dorso de la lengua y la pérdida de la sensibilidad. (Schlagenhauf 2005)

Un estudio donde se investigo el desarrollo de la gingivitis bajo la influencia de clorhexidina en ausencia del cepillado dental, se encontró que durante un periodo mayor a 3 semanas, sin higiene practicada, la formación de placa dental y la prevención de gingivitis fueron prevenidas de manera efectiva haciendo 2 enjuagues diarios con solución al 0.2% de clorhexidina. (Stoeken 2007).

Por lo tanto dicho producto ha sido reconocido como el más destacado antiséptico oral durante las tres últimas décadas; y durante años ha sido desarrollada la clorhexidina en gel, sprays y en colutorios (enjuagues bucales), en presentaciones al 0.2, 0.1 y 0.12%, en gel al 0.1%, en dispositivos de liberación lenta como barnices y fibras, y puede ser incorporada a pastas dentales y chicles.

3.9.-Clorhexidina sobre el tejido peri-implantario

La salud del tejido peri-implantario juega un papel importante como barrera biológica contra las bacterias . Ya que la inflamación del tejido blando peri-implantario ha sido asociada con un 30% de los fracasos.

Es posible inhibir significativamente la proliferación de gérmenes orales mediante tratamientos químicos adecuados. El amplio espectro de acción de la clorhexidina de carácter inespecífico, su baja toxicidad sistemática y la duración prolongada de su efecto la convierten, en sus diferentes formas de presentación, en el antiséptico oral por excelencia. (Schlagenhauf 2005).

Se recomienda el uso al 0.12% 10 ml, para prevenir ulceración del tejido alrededor del mini-implante y mejorar la comodidad del paciente.

Es usada después de la colocación del mini-implante, como mínimo 2 veces al día y de preferencia después de la comida, debido a que además de sus propiedades antibacterianas que minimizan la inflamación del tejido, promueve

una lenta epitelización y puede reducir la posibilidad de aumento de tejido blando alrededor del mini-implante.

La naturaleza cationica de la clorhexidina permite su adherencia de una manera persistente a los tejidos blandos y al esmalte proporcionando un efecto bacteriostático y bactericida de manera prolongada.

3.10.- Acción Antimicrobiana de la Clorhexidina

La acción antimicrobiana del digluconato de clorhexidina ha sido descrita por diversos autores. Estudios *in vitro* demuestran que en bajas concentraciones la clorhexidina causa daño a la membrana celular y escape de moléculas de bajo peso molecular de los microorganismos. En cambio, en altas concentraciones, causa precipitación y coagulación de proteínas en el citoplasma de los microorganismos expuestos. Dichas propiedades, interfieren de esta manera con la formación del biofilm o bien de la placa bacteriana, previniendo el crecimiento bacteriano.

H. Jarvinen y colaboradores en su estudio observaron la susceptibilidad del *streptococcus mutans* a la clorhexidina junto con otros seis agentes antibacterianos como penicilina, amoxicilina, sulfametoxazol, trimetropim, tetraciclina, eritromicina, cefuroxime, encontrando que esta bacteria fue susceptible a todos ellos; sin embargo permaneció susceptible de manera más importante a la clorhexidina. (Jarvinen 1993).

En otro estudio, McBain y colaboradores evaluaron la susceptibilidad de varios tipos de muestras bacterianas a la clorhexidina, observando que la más susceptible fue *A. Naeslundii*, seguida por bacterias gram negativas como *Porphyromona gingivalis*, *Streptococcus Mutans* y *S sanguis*. (Mc Bain y cols 2003)

Además, un estudio en pacientes con ortodoncia se llevo acabo por Khan. El evaluó la eficacia de un barniz de clorhexidina sobre las condiciones gingivales así como el conteo de *Streptococcus mutans*, observando que con la aplicación

de dicho producto se reduce significativamente el conteo bacteriano, así como mejora la salud gingival, por lo que se concluye que la clorhexidina es una excelente opción para pacientes con aparatología fija (Khan 2010).

De igual manera muchos estudios a corto plazo se han realizado, y muestran que los enjuagues con clorhexidina tienen un efecto de amplio espectro antimicrobiano, reduciendo el número de bacterias anaerobias facultativas u obligadas en la placa supragingival.

3.11.- Citotoxicidad de la Clorhexidina

Jeffery y colaboradores en su estudio utilizaron fibroblastos humanos derivados de la piel y de los tejidos orales para poner a prueba los efectos de clorhexidina en la viabilidad celular. Las células se expusieron durante una hora a 0.005% y 0.002% de clorhexidina, y a 30 segundos al 0.12% de clorhexidina. Los resultados de este estudio demostraron que con una concentración al 0,002% de clorhexidina se tiene una citotoxicidad mínima, aunque esta es capaz de suprimir la división celular casi por completo. Por lo que ellos concluyen que la clorhexidina es altamente citotóxica para las células in vitro, pero diversas funciones celulares tales como la proliferación y la síntesis de proteínas se ven afectadas en diferentes rangos por la clorhexidina (Jeffery 1992).

En otro estudio se evaluaron los efectos citotóxicos de diferentes concentraciones de clorhexidina de 0,06%, 0,12%, 0,2%, 1% y 2%, en cultivos celulares de odontoblastos durante 60 segundos y 2 horas, con un período de recuperación de 24 horas; evaluando el metabolismo celular por medio del ensayo de MTT. Se encontró que sin importar el tiempo de exposición, todas las concentraciones de clorhexidina tenía un alto efecto citotóxico directo en las células cultivadas. Es decir, cuanto mayor sea la concentración de clorhexidina y más largo el tiempo de contacto con las células, más fuerte son sus efectos citotóxicos (Rosetti 2010).

3.12.-Nanotecnología

El término de nanotecnología fue definido por primera vez en 1974, en la universidad de ciencia de Norio Taniguchi en Tokio, describiéndola como el procesamiento de la separación y consolidación de los materiales por un átomo o molécula. (Mritunjai 2008).

En la década 1980 la nanotecnología recibió un importante impulso, con dos acontecimientos importantes: el nacimiento de la ciencia del cluster; y la invención del microscopio de efecto túnel (STM). Existen tres tipos distintos de nanotecnología las cuales son dependientes una de la otra. El primer tipo es la nanotecnología húmeda, que es el estudio de los sistemas biológicos que existen principalmente en el ambiente del agua, siendo aquí el material genético, las membranas, enzimas y otros componentes celulares el material de interés. El segundo tipo es la nanotecnología seca, que abarca la ciencia de las superficies químicas y físicas. Esta se centra en la fabricación de estructuras como el carbono, silicio, y otros materiales inorgánicos, así como el uso de metales y semiconductores. Finalmente la nanotecnología computacional que permite el modelado y la simulación de complejas estructuras de escala nanométrica (Mritunjai 2008).

La nanotecnología es entonces aquello que se desarrolla a partir de un conjunto de técnicas útiles para manipular la materia a escalas de átomos y moléculas de diversos elementos como la plata, oro, entre otros. Las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a la escala nanométrica, es por ello que los científicos utilizan la nanotecnología para crear materiales, aparatos y sistemas novedosos, poco costosos con propiedades únicas.

La “nano-terapéutica” también ofrece la posibilidad de controlar la formación de biofilms orales mediante el uso de nanopartículas con propiedades biosidas y anti-adhesivas (RP Allaker 2009). La incorporación de nanopartículas en los recubrimientos de mini-implante, puede ofrecer funcionalidades antimicrobianas útiles para evitar el fracaso del mini-implante dental. La explotación de sus atributos únicos para combatir las infecciones se ha incrementado notablemente

en la última década. Al igual que sus investigaciones en las aplicaciones en la odontología.

3.13.-Nano partículas de Plata

La plata (Ag) es un metal de transición, clasificado como “semi-noble”, que tiene un número atómico de 47 y una masa atómica de 107.87 gr/mol. Los usos medicinales de plata se han documentado desde el año 1000 A.C.. Su acción de antibiótico proviene del hecho de que es tóxico no-selectivo, con una gran capacidad biosida, matando alrededor de 650 diferentes organismos que causan enfermedades. La plata tiene distintas aplicaciones actualmente, ya que se utiliza en conservadores de la madera, en la limpieza después de cosecha de ostras, en el microdyn para desinfectar las verduras, como conservador en los productos cosméticos y artículos de tocador. Así también en la medicina ha sido ampliamente utilizado como apósito tópico para el tratamiento de infecciones, en las quemaduras, heridas abiertas y úlceras crónicas (Mritunjai 2008).

Desde hace muchos años, se ha hablado de las propiedades de la plata y de sus características antimicrobianas, de su amplia historia en la aplicación en la medicina con una respuesta de los tejidos bien tolerada y su perfil de baja toxicidad, que es más tóxico que muchos otros metales contra un amplio espectro de bacterias sésiles Gram positivas y Gram negativas, protozoarios, virus y hongos. Incluyendo los resistentes a los antibióticos (Ki-Young, 2011); (Samuel U. y col, 2004); (Douglas R. 2009). Estas propiedades se cree que resulta de la interrupción del metabolismo, de la energía y los sistemas de transporte de los electrolitos, que se produce cuando los iones de plata se unen a las proteínas bacterianas (Roe David 2008).

Se ha descrito que la plata presenta una fuerte toxicidad contra las bacterias gram-negativas y gram-positivas, donde la diferencia estructural radica en la organización de un componente clave de la membrana, el peptidoglicano. Las gram-negativas cuentan con una capa delgada de peptidoglicano de aproximadamente 2 a 3 nm, que se encuentra entre la membrana del citoplasma y la membrana externa. Las bacterias gram-positivas carecen de membrana

externa, aunque si cuentan con una capa de peptidoglicano de aproximadamente 30 nm de espesor (Mritunjai Singh 2008). En consecuencia, las bacterias gram-positivas son menos susceptibles que las negativas a reaccionar con agentes antibacterianos que contienen iones de plata (Douglas R. 2009).

La plata es una reciente promesa, debido a la resistencia de ciertas bacterias a los antibióticos como resultado del abuso de ellos, lo cual es un problema real. Como se ha reportado, las nanopartículas de plata son un antimicrobiano muy efectivo (Madhumathi K. 2010); dado que las partículas de metal en el intervalo de tamaño nanométrico presentan propiedades físicas que son diferentes del ion de plata, proporcionando propiedades notables tales como aumento de la actividad catalítica (Mritunjai, 2008).

Aunque existe poca información sobre el efecto antibacteriano de los iones de plata y las nanopartículas de plata en condiciones anaeróbicas, se han hecho estudios por medio de la zeolita de plata, siendo evaluadas una serie de especies orales, anaerobios facultativos, obligados; especies gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Actinobacillus aggregatibacter*; que han mostrando ser más susceptibles que las especies gram-positivas como el *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, y *Actinomyces viscosus*, a las actividades antimicrobianas (RP Allaker 2009).

Estudios recientes muestran que la disposición antimicrobiana de plata en la nanotecnología es eficaz contra los patógenos asociados con bio-películas, incluyendo *E coli*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *A.niger* (Park EJ, Bae E, 2010). Se ha informado de igual manera que los compuestos de plata son altamente tóxicos para las células procariontas, ya que muestran fuertes efectos biocidas en las bacterias, mientras que tienen un efecto menor en células eucariotas, tales como hongos y levaduras (Ki-Young Nam ,2011).

Ahora bien se han desarrollado distintos estudios con el fin de reducir la adhesión bacteriana a los materiales dentales. Ahn SJ incorporó nanopartículas de plata a los adhesivos ortodonticos, encontrando que producían una significativa reducción de la adhesión de *Streptococcus cariogenicos*, y no

provocaban alguna alteración en la fuerza de enlace del adhesivo ortodóntico; mientras que el efecto antimicrobiano se mantuvo después de estar en contacto con la saliva (Douglas M, 2009).

Es evidente que a lo largo de los años se ha observado que estos compuestos exhiben notables efectos antimicrobianos, de ahí su amplio uso en electrodomésticos como las lavadoras; en sistema para la purificación del agua; productos de higiene personal como la pasta dental, shampoo, enjuagues, desodorantes; filtros: utensilios de cocina; juguetes; pintura (García Contreras R 2011)(Kim Yongs 2010); y apósitos con plata en dispositivos médicos (Madhumathi K. 2010). De igual modo, se ha sido estudiado su uso en aplicaciones dentales como materiales de restauración, implantes dentales, soluciones inhibitorias de caries, y en cementos endodónticos (García Contreras R, 2011).

El mecanismo de acción antimicrobiana de los iones de plata libre se puede describir de la siguiente manera. Los iones de plata forman compuestos insolubles con los grupos sulfhidrilo de la pared celular de las bacterias y hongos: que son componentes esenciales de las enzimas responsables del metabolismo de la energía y el transporte de electrolitos. Estos iones bloquean la cadena respiratoria de las bacterias y entran en la célula y se unen al ADN bacteriano. Por lo que se han utilizado para crear distintos productos médicos como los catéteres donde su citotoxicidad, hemo-compatibilidad y la trombogenicidad de estos materiales impregnados con plata, se ha determinado y muestran excelentes resultados (Samuel U, y col, 2004).

Con respecto a las nanopartículas de plata, se han recubierto superficies o incorporado a diversos materiales, ya que las nanopartículas de plata tienen diferentes aplicaciones biomédicas por su alto efecto antimicrobiano, y su actividad biocida demostrada contra ambas especies de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Además, las nanopartículas de plata presentan una toxicidad nula en tejidos humanos al utilizarse en bajas concentraciones, por lo que son ampliamente utilizadas en el área médica como acondicionadores

de tejidos, catéteres, cubierta de materiales así como en algunos materiales dentales (Liu HL, 2010) (Allaker RP ,2010).

Estas nanopartículas liberan iones de plata en las células aumentando su actividad bactericida; así como debido a su tamaño, las nanopartículas de plata poseen mejor y mayor superficie de contacto con las bacterias, es por ello que su actividad antibacteriana es alta (más que la de los iones plata en disolución), incluso en concentraciones muy bajas (Madhumathi K, 2010). Mritunjai Singh también hace mención de los efectos antibacterianos de las nanopartículas de plata a bajas concentraciones.

Se ha demostrado una relación inversa entre la actividad antimicrobiana y el tamaño de las nanopartículas, mencionándose en estudios que existe una mayor actividad antibacteriana en nanopartículas de pequeño tamaño a diferencia de las de mayor tamaño; aunque la disminución en el tamaño de las nanopartículas conlleva a un incremento en su citotoxicidad (Liu HL , 2010); (Allaker RP ,2010).

Morones y colaboradores en su estudio observaron el comportamiento antimicrobiano de las nanopartículas de plata evaluándolas a distintos tamaños de un rango de 1 a 100 nm en bacterias gram-negativas, concluyendo que la capacidad antimicrobiana es dependiente del tamaño; y que las únicas nanopartículas que presentan una interacción directa con las bacterias preferentemente tienen un diámetro de 1-10 nm, es decir las más pequeñas (Morones 2005).

Por lo que el tamaño de las partículas puede desempeñar un papel crítico tanto en las propiedades antibacterianas como en la citotoxicidad de las nanopartículas de plata. Ya que ha sido sugerido como un parámetro principal que determina el potencial de inducir respuestas de las citoquinas inflamatorias. (Banu S, 2010). Las citocinas como la IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, IL-12 y TGF- β se incrementaron de una manera dependiente de la dosis de nanopartículas de plata repetidas por vía oral en ratones, además del incremento de la producción de la inmunoglobulina E. Con base en estos resultados que obtuvieron se

sugiere que la administración de tamaño nano de las nanopartículas de plata puede causar toxicidad en los órganos y las respuestas inflamatorias en ratones (Park EJ. y col, 2010).

Kim en el 2010 reporto que el nivel mas bajo de efecto adverso toxico observable era a una dosis mediana de 125 mg/kg mientras que el nivel sin efecto adverso toxico observable era en una dosis baja de 30mg/kg en ratones por vía oral(Kim Yongs 2010).

Los mecanismos de la actividad antimicrobiana de los metales de nanopartículas no se conoce completamente, pero existen estudios que han demostrado que la carga positiva del ion metálico es fundamental para la actividad antimicrobiana, lo cual permite la atracción electrostática entre la carga negativa de la membrana celular de las bacterias y las nanopartículas cargadas positivamente (Kim JS, y Col, 2007). Otros apuntan distintos mecanismos como la acción inhibitoria de los iones de plata sobre los microorganismos, ya que el ADN pierde su capacidad de replicarse (Allaker RP, 2010). Se ha demostrado que las nanopartículas de plata causan la inactivación de bacterias y evitan la replicación bacteriana in-vitro (Liao J, 2010). Así como que la alteración de la homeostasis del calcio juega un papel importante en las condiciones patológicas y toxicológicas siendo un signo temprano del daño celular. Ya que los iones de calcio tienen el potencial para activar las enzimas catabólicas como la fosfolipasa, las proteasas y estas aumentan la toxicidad. Por lo que en los estudios de Asharani, vincula que el estrés oxidativo, el calcio y el agotamiento de ATP se producen en las células tratadas con nanoparticulas de plata (Asharani PV, 2009).

Otro de los mecanismos de actividad antimicrobiana se realiza por medio de los iones de plata que afectan a las enzimas de membrana respiratoria. Mientras que en el estudio de Sondi (Sondi I, y col. 2004),demostró cambios estructurales y daños a las membranas bacterianas, lo que resulta en la muerte celular. Estos estudios sugieren que todo el azufre que contienen las proteínas y enzimas, son clave en la membrana o dentro de las células así como los elementos que tienen fósforo, como el ADN, siendo los probables sitios preferenciales de unión para las nanopartículas de plata. Kim sugiere que una

célula bacteriana en contacto con nanopartículas de plata inhiben las enzimas respiratorias y de esta manera facilita a la generación de radicales libres para dar paso al daño de la membrana (Kim JS 2007).

Ha sido reconocido que las nanopartículas de plata tienen una actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram negativas produciendo unas perforaciones en forma de huecos en la pared bacteriana, lo cual produce que la morfología de la membrana cambie, incrementando su capacidad permeable y facilitando la muerte celular (García Contreras R 2011). Estos mismos hallazgos por Madhumathi, quien a través de andamios de quitina y nanopartículas de plata para aplicaciones de cicatrizaciones de heridas, realizó pruebas antimicrobianas contra *S Aureus* y *E coli*, encontrando que hay una actividad antimicrobiana eficiente principalmente sobre *E coli*. Esto puso en evidencia que existe una zona de inhibición de crecimiento bacteriano y mayor susceptibilidad en las bacterias Gram negativas a diferencia de las Gram positivas. Esto se debe posiblemente, a que la bacteria Gram positiva está cubierta por una delgada membrana de peptidoglicanos, la cual limita la penetración de las nanopartículas de plata. Así también se observó que si se incrementa la concentración de nanopartículas de plata, la zona de inhibición aumentaba (Madhumathi K. 2010).

Con la idea de que las nanopartículas de plata alteran la estructura de la membrana al unirse a las proteínas que contienen azufre de la membrana celular, se produce un daño a la membrana de las bacterias (Asharani PV, 2009). Por otra parte Liao en su estudio sobre el efecto antimicrobiano de la deposición de nanopartículas de plata en una superficie de titanio, sostiene que las nanopartículas de plata muestran propiedades antimicrobianas eficaces gracias a su superficie muy grande que ofrece un contacto efectivo con los microorganismos, dado que estas nanopartículas liberan iones de plata en solución acuosa, con lo que aumenta su actividad bactericida. Así también afirma que existen dos mecanismos de inhibición de la formación de la placa microbiana, la primera es la inhibición de la adhesión inicial de las bacterias y la segunda, la de inhibir la colonización de bacterias (Liao, 2010)

3.14.-Toxicidad de la nanotecnología

Los claros beneficios de la utilización de productos de tamaño nanométrico en diversas aplicaciones biológicas y médicas, son desafiados por las preocupaciones sobre la falta de información adecuada acerca de su toxicidad. Lo anterior se debe a que el reconocimiento involuntario de las nanopartículas como extrañas por las células inmunes, pueden dar lugar a una respuesta inmune contra las nanopartículas y, finalmente, llevar a la toxicidad.

Se a informado que los órganos blancos de las nanopartículas de plata son principalmente el hígado y el pulmón, esto se a demostrado en estudios realizados en ratas (Ki-Young Nam, 2011).

Se conoce muy poco acerca de las interacciones de las células con los nanomateriales, sus mecanismos tanto de absorción, distribución, sus parámetros toxicológicos y mecanismos de acción . El estudio de PV AshaRani, en donde los fibroblastos de pulmón humano expuestos a las nanopartículas de plata in vitro, mostraron que existe una distribución de estas nanopartículas de plata uniforme, tanto en el citoplasma como en el núcleo, Dejo ver que existía una inestabilidad cromosómica y solo unas pocas de estas células entraban en el proceso de mitosis. Concluyendo así que la supervivencia de las células del daño mediado por las nanopartículas, depende de su capacidad para expulsar éstas (PV AshaRani, 2009).

El grado de absorción se rige principalmente por el tamaño de las nanopartículas, la carga superficial, hidrofobicidad y la presencia o ausencia de ligandos de superficie. En general se acepta que la absorción aumenta con la disminución del diámetro de las partículas de tamaño inferior a 1nm (Katrin Loeschner, 2011).

Se ha demostrado que la toxicidad es dependiente de la concentración, como las concentraciones de nanopartículas de plata entre 5 µg/ml inducen a necrosis o apoptosis de las células madre espermatozonales de los ratones (Douglas R.M. 2009).

Existen estudios que señalan a las nanopartículas de plata, como citotóxicos uno de ellos realizados por medio de la prueba de MTT en India, donde se puso a prueba andamios de quitina con nanopartículas de plata en un medio de cultivo de fibroblastos de ratas, mostrando una citotoxicidad *in-vitro*, aludiendo que esta citotoxicidad es debida a las nanopartículas de plata presentes en estos andamios, pero si ésta puede tener algún efecto sobre la herida que cura es dudosa, estudios anteriores como los de Ong S.Y. en el 2008, demostraron que las nanopartículas de plata que contienen los vendajes para heridas son, *in-vitro* citotóxicos, mientras que *in vivo* muestra una buena respuesta (Madhumathi K. 2010).

El efecto tóxico de las nanopartículas de plata, es proporcional a la actividad que puedan realizar los iones de plata liberados de las nanopartículas de plata. García en su estudio de la perspectiva de uso de las nanopartículas menciona que varios estudios *in-vitro* en distintas líneas celulares como células hepáticas, células madre germinales, fibroblastos, queratinocitos entre otras, expuestas a las nanopartículas de plata, muestran una disminución en las funciones mitocondriales. Mientras que él observa que los estudios *in vivo* expuestos a estas nanopartículas pueden dar como resultado inflamación, estrés oxidativo, infarto al miocardio y trombosis; del mismo modo las nanopartículas de plata pueden dañar el DNA causando mutaciones, es por ello que él concluye, que las nanopartículas de plata en la práctica dental requiere de más estudios con respecto a su toxicidad en los sistemas biológicos, por ello considera que las nanopartículas de plata pueden ser utilizadas provisionalmente en odontología (García Contreras; 2011).

También hay estudios que nos muestran las nanopartículas de plata como una buena opción de acuerdo a los resultados obtenidos, un ejemplo de esto es el estudio realizado en los estados unidos en el 2008 donde, se examinó la liberación de plata tanto *in vitro* como *in vivo en ratones*, donde se implanto un catéter depositado con nanopartículas de plata, arrojando resultados satisfactorios, mostrando que los ratones no mostraron signos de toxicidad, manteniendo un estado saludable durante los 10 días del experimento. Así como, no había ningún signo de inflamación o infección en el sitio de

implantación del catéter, el único dato encontrado fue la presencia de una ligera pérdida de peso así mismo se observó que la excreción de plata de dicha deposición, en la orina y en las heces era muy baja siendo 0.1%, así también se detectó una cantidad pequeña de plata en el sitio de implantación del catéter mientras que otros órganos o muestras de tejidos, incluyendo los pulmones, no se detectaban niveles de plata por lo que se puede pensar que la deposición de nano partículas de plata puede llegar a ser una buena opción de revestimiento. Obteniendo como en este estudio materiales no tóxicos capaces de tener una liberación dirigida y sostenida de plata bactericida en el lugar de implantación (Roe David 2008).

3.15.-Efectos de las nanopartículas de plata su citotoxicidad, propiedades antimicrobianas, sobre implantes dentales

En lo referente a los implantes dentales recientemente se han descrito distintos procedimientos que consisten en depositar sobre la superficie de la nueva pieza dental, distintos materiales que favorecen la integración de éstos, aumentando su estabilidad y proporcionando efectos antimicrobianos. En esta actividad antimicrobiana de la plata se pueden identificar por la prevención de la adherencia en la superficie de la proliferación de bacterias adheridas a una superficie y de la formación de biopelículas, incluso en concentraciones que no son bactericidas (Samuel U, y col; 2004).

La incorporación de nanopartículas de plata 40-60-nm depositadas en un material de titanio estándar han sido evaluadas, observándose una reducción significativa en el recuento de biofilm después de 7 días con el recubrimiento con nanopartículas de plata, en comparación con el material de titanio estándar. (Allaker RP, 2010) La adhesión de bacterias a la superficie de titanio tratada con nanopartículas de plata mostró propiedades anti-adhesivas, esto se debe a la inhibición por contacto directo y a las propiedades anti-adhesivas de la superficie de titanio con nanopartículas de plata, por lo que se reduce el riesgo de colonización bacteriana (Liao J, Zhu Zhimin, 2010).

En los estudios para demostrar las actividades antimicrobianas de las nano partículas de plata, se han realizado en las bacterias orales como la *Porphyromonas gingivalis* y *Actinomyces comitans* consideradas unas de las principales bacterias periodontales, demostrando que el 94.7% de *Actinobacillus actinomyces comitans* y 93% *Porphyromonas gingivalis* fueron inhibidos en la superficie de titanio con nanopartículas de plata y dan cuenta de una buena actividad antimicrobiana.

En otros estudios se realizaron pruebas con las nanopartículas de plata sobre los *Staphylococcus aureus* en los siguientes estudios (Liao J, 2010); (Ki-Young Nam, 2011); (Shameli K, 2011) *Escherichia coli*, (Liao J, Zhu Zhimin, 2010) (Roe David 2008) *Candida Albicans*, (Roe David 2008); (Ki-Young Nam, 2011), *Streptococcus mutans* (Ki-Young Nam, 2011), *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, (Roe David 2008); demostrando en todos ellos una actividad antimicrobiana significativa frente a todos los microorganismos dando la inhibición de su crecimiento .

Así también Gluckermann, en su estudio *in vitro*, llega a la conclusión, que la superficie recubierta con plata puede resultar ser un medio convenientemente eficaz, para proporcionar una actividad antimicrobiana en las superficies de implantes. Observó los efectos antibacterianos de la superficie titanio recubierta con plata, determinando una actividad antimicrobiana significativamente alta contra *Staphylococcus epidermis*, *Klebsiella pneumonia*, reduciendo la adhesión inicial bacteriana y al mismo tiempo demostró que no existía un efecto de citotoxicidad en células epiteliales y en osteoblastos (Ewald A, y col, 2006);(Karthikeyan Subramani, y col 2009).

David roe también apoya el uso de las nanopartículas de plata como recubrimientos en materiales ya que la plata liberada es activa contra los microorganismos y predominantemente se acumula en el sitio de inserción, lo que sugiere que los materiales recubiertos con nanopartículas de plata podría proporcionar una protección mejorada contra las infecciones locales, sin riesgo de toxicidad sistémica, según el estudio *in vivo* y *in vitro*, en los catéteres de plástico con nanopartículas de plata (Roe David y Col 2008).

Existen estudios realizados en China, donde han tratado de depositar nanopartículas de plata sobre una superficie de titanio para obtener propiedades antimicrobianas, usando el medio de silanización, a través de dos especies, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, ya que a estas bacterias han sido informadas como los patógenos más comunes en las infecciones asociadas a biomateriales, por lo que se consideran adecuadas para tales pruebas antibacterianas de la superficie de los implantes con nanopartículas de plata. Resultado de ello es que el 94% de los *Staphylococcus aureus* y el 95 % de *Escherichia coli*, habían sido eliminados en la superficie del implante de titanio con nanopartículas de plata; del mismo modo se demostró que solo una pequeña cantidad de nanopartículas de plata, se pueden depositar en la superficie de titanio, teniendo un diámetro entre 10 a varios cientos de nm (Liao J, Zhu Zhimin, 2010).

Ahora bien, Liao J y Anchun M, en su estudio titulado las nanopartículas de plata depositadas en placas de titanio, muestran bio-compatibilidad en las células. Éste consistió en desarrollar una nueva superficie antibacteriana en los implantes de titanio y probar su funcionamiento biológico. Los resultados muestran que las superficies de titanio con nanopartículas de plata, presentan una citotoxicidad mínima de los fibroblastos gingivales humanos, lo cual hace evidente que estos fibroblastos, comienzan a adherirse a la superficie de titanio después de 3 hrs de cultivo; a las 12 horas, las células parecían formar contactos con los fibroblastos adyacentes, empezando a alinearse y a observarse de forma alargada y plana, íntimamente unidos a la superficie, lo que indica una buena adhesión a la superficie de estos. Lo anterior sugiere que la morfología de las células no se ve afectada, por la superficie modificada con nanopartículas de plata, así como que estas células presentaban una arquitectura normal, sin mostrar una citotoxicidad detectable. Los datos de este trabajo indican que la superficie de titanio modificada con nanopartículas de plata, representa una opción con buenas propiedades tanto anti-bacterianas, como con una citotoxicidad mínima, que puede ser utilizado como un material implantado (Liao J, Anchun M 2010).

Por todo lo anteriormente afirmado se puede decir que las nanopartículas, deben su eficacia biocida tanto a su tamaño, como a su alta relación superficie-volumen. Tales características, permiten interactuar de cerca con las membranas microbianas, ya que el efecto se debe exclusivamente a la liberación de iones metálicos. Entonces el potencial de las nanopartículas de plata para controlar la formación de biopelículas dentro de la cavidad oral, está actualmente sometida a un análisis exhaustivo. Así como se está prestando especial atención a los problemas de toxicidad en torno al impacto potencial de las nanopartículas de los tejidos orales.

De acuerdo a estos estudios se puede trazar la idea de que las nanopartículas de plata en la superficie de un mini-implante dental, representa la alternativa de un material prometedor con propiedades antibacterianas, anti-adhesivas y sin compromiso citotóxico, situación que permite utilizarlo como un biomaterial implantable en la cavidad oral.

3.16.-Microbiología implantes;

Las propiedades de la superficie de los materiales del implante influyen de manera importante la adhesión bacteriana y de esta forma también inciden en la presencia de peri-implantitis.

Los colonizadores tempranos como los *Streptococos* y *Actinomyces*, crean un ambiente indicado para los colonizadores tardíos como *Porphyromonas Gingivalis* y *Fusobacterium Nucleatum*. Es por ello la importancia del desarrollo de una superficie del implante, que pueda minimizar el número de colonizadores microbianos, dado que por la superficie áspera de los implantes facilita dicha colonización (Karthikeyan Subramani, y col, 2009).

El estudio de Mombelli alude que los colonizadores microbianos iniciales en los implantes con éxito de osteointegración, prevalecen los Gram positivos facultativos que se establecen después de la implantación, identificándose el 80% que correspondían a cocos Gram positivos facultativos, en la flora de pacientes edentulos, mostrando que durante los primeros 6 meses después de

dicha inserción, la flora no manifiesta cambios significativos. En tanto que a los 2 años se encuentra que el 50% de ellos seguían mostrando cocos Gram positivos facultativos; el 17% correspondían a bacilos anaerobios y el 7 % eran Gram negativos, *Fusobacterium sp* y *la Prevotella Intermedia* se encontraban en el 9%; mientras que las *Porphyromonas gingivalis* y *Espiroquetas* no se encontraron. Lo mismo se realizó en años siguientes encontrando los mismos resultados. Sin embargo el 41% de los implantes con fracasos, muestra una flora de bacilos Gram negativos anaerobios con microorganismos como *P. intermedia*, y *Fusobacterium sp*. Por lo cual existe mayor presencia de Gram negativos anaerobios en los sitios con pérdida ósea o bien con supuración (A. Mombelli 1993).

3.17.-Nanopartículas de plata efecto antimicrobiano

Ha sido reconocido que las nanopartículas de plata tienen una actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram negativas, generando unas perforaciones en forma de huecos en la pared bacteriana, haciendo que la morfología de la membrana cambie, incrementando su capacidad permeable y facilitando la muerte celular. La lisis bacteriana puede ser considerada como otra de las razones de esta propiedad, las nanopartículas de plata modulan el perfil de la fosfo-tirosina de los péptidos bacterianos supuestos, los cuales pueden afectar la señal bacteriana de transducción e inhibir el crecimiento de estas bacterias. Así también a sido descrito que la plata induce a una desnaturalización o a la oxidación de la pared celular la cual permite esta ruptura de las organelas que se encuentran dentro de ellas, resultando así la muerte bacteriana (García Contreras. R. 2011).

Mritunjai Singh hace mención de tres efectos de las nanopartículas de plata contra las bacterias Gram negativas; 1- las nanopartículas dentro del rango de 1-10 nm se unen a la superficie de la membrana de la célula, alterando drásticamente su funcionamiento, así como la permeabilidad y la respiración. 2- las nanopartículas son capaces de penetrar dentro de la bacteria y causar más daños por la posibilidad que tienen de interactuar con azufre y fósforo que son compuestos que contiene el ADN. 3- las nanopartículas pueden liberan iones de

plata, las cuales tienen una contribución adicional al efecto bactericida de las nanopartículas de plata

Siendo el efecto de la dosis de las nanopartículas de plata más pronunciado contra organismos gram negativos que las gram-positivas. Así también el efecto antibacteriano de las nanopartículas es independiente de la adquisición de resistencia por parte de las bacterias contra antibióticos (Mritunjai Singh, 2008).

Madhumathi K, realizó pruebas antimicrobianas contra *S. aureus* y *E. coli*, poniendo de manifiesto que hay una actividad antimicrobiana eficiente principalmente sobre *E. coli* (gram negativa) mostrando mayor susceptibilidad en las bacterias gram negativas a diferencia de las gram positivas. Alude que esto se debe posiblemente a que la bacteria gram positiva, está cubierta por una delgada membrana de peptidoglicanos, la cual limita la penetración de las nanopartículas de plata; así también observó que si se incrementaba la concentración de nanopartículas de plata, la zona de inhibición incrementaba (Madhumathi K. 2010).

Las diferencias entre las distintas especies puede influenciar en la susceptibilidad de los agentes antimicrobianos, las células Gram positivas contienen 3-20 veces más peptidoglicanos que las Gram negativas. Los peptidoglicanos presentan una carga negativa y ellos probablemente ciegan alguna porción de los iones de plata, por consiguiente, las bacterias Gram positivas son menos susceptibles a ellos (Douglas M,R 2009).

Las nanopartículas que están entre los rangos de tamaño de 1-10 nm , tienen una mayor actividad biocida contra bacterias (Allaker RP; 2010).

Liu en su estudio sobre el tamaño de las nanopartículas demuestra, que a menor tamaño existe una mayor actividad antibacteriana contra las bacteria de *E. coli* y *Streptococcus aureus*, donde se observa que esta actividad antimicrobiana, se reducía con el aumento de tamaño de las nanopartículas de plata, lo cual sugiere, que la mayor área de superficie específica en las pequeñas nanopartículas de plata, puede aumentar la oportunidad para la interacción con la superficie bacteriana y así promover un mayor efecto antibacteriano. Se acotó también que las nanopartículas de plata de tamaños

más pequeños, presentan una alta citotoxicidad a mayores concentraciones. (Liu HL 2010).

En el estudio de AshaRani, los fibroblastos de pulmón humano y las células de glioblastoma humano fueron expuestos a diferentes dosis de nanopartículas de plata *in vitro*, dando como resultado, que la endocitosis es la principal vía de captación de las nanopartículas de plata. Así también se reveló una distribución uniforme intracelular de estas nanopartículas de plata, tanto en el citoplasma como en el núcleo, evidenciadas a través del microscopio electrónico. Esto muestra que las células tratadas con nanopartículas de plata mostraron una inestabilidad cromosómica y arresto mitótico en las células humanas. En este estudio, la toxicidad de las nanopartículas de plata son mediadas a través del calcio intracelular, junto con los transitorios de alteraciones significativas de la morfología celular y la difusión de la superficie (AshaRani 2009).

3.18-Deposición de Nanopartículas de plata en materiales

David Roe nos menciona sobre la deposición de nanopartículas de plata (600mg) (3,7 mg/g) en catéteres de plástico para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* por medio de los siguientes microorganismos *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* encontrando una actividad antimicrobiana significativa frente a todos los microorganismos, también se examinó la liberación de plata tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones, donde se implantó lo equivalente a un catéter de 28 cm (0,8 g de plata) aquí los ratones no mostraron signos de toxicidad pero sí un aspecto saludable durante los 10 días del experimento. En particular, no había ningún signo de inflamación o infección en el sitio de implantación del catéter el único dato encontrado fue la presencia de pérdida de peso por parte del ratón disminuyendo en un 8%, así mismo se observó que la excreción de plata en la orina era muy baja siendo 0.1% del total de la plata depositada, se observó que una cantidad significativa pero pequeña de plata se detectó en el sitio de implantación, observándose que todos los otros órganos o muestras de tejidos, incluyendo los pulmones, no se detectaban niveles de plata y si se detectaban eran menores del 0,1%. Con lo que se determinó que es que estos catéteres

son dispositivos no tóxicos capaces de tener una liberación dirigida y sostenida de plata bactericida en el lugar de implantación y pueden llegar a resultar útiles en la prevención de complicaciones infecciosas en este caso de pacientes con catéteres permanentes, por lo que podemos pensar que de igual manera podría reflejarse esto en los mini – implantes con fines ortodonticos (Roe David 2008).

En un estudio Chino, Liao y colaboradores reportaron, la actividad antimicrobiana de la superficie de titanio con nanopartículas de plata poniendo esta, a prueba contra, bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y bacterias Gram positivas como el *Staphylococcus aureus*. En este estudio se adoptaron dos métodos, ZOI y las pruebas FAC, para determinar la actividad antibacteriana; la segunda se basa en el efecto inhibitorio directo, el cual exhibió una propiedad antibacteriana fuerte, después de 24 horas de incubación de la bacteria en la superficie de titanio con nanopartículas de plata, Este experimento dió como resultado que el 94% *Staphylococcus aureus* y más del 95% de *Escherichia Coli* en la suspensión de bacterias, murieron.

Mostrando así que la superficie de titanio con nanopartículas de plata, inhibe significativamente el crecimiento de los *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, a comparación de la superficie de titanio pulido.

Mientras que en la prueba de Zoi, la cual se basa en la liberación de los iones de plata de la superficie, donde la inhibición del crecimiento bacteriano depende de la concentración suficiente de iones plata en el entorno acuoso, no mostró propiedades antibacterianas

Las micrografías por microscopia electrónica de barrido se observaba que sólo un pequeño porcentaje de la superficie de titanio, fue cubierto por las nanopartículas de plata, representando apenas el 4.26% de la superficie. Así mismo la microscopia electrónica de barrido, dejó en claro que había mucho menos bacterias adheridas a la superficie de titanio con nanopartículas de plata, que en la superficie de titanio control, por lo que se llegó a la conclusión de que la superficie de titanio con nanopartículas de plata, reduce el riesgo de la colonización bacteriana (Liao J, Zhu Zhimin,2010).

Usando tanto, el ensayo MTT, la microscopia de fluorescencia y microscopia electrónica de barrido, se evaluó la virilidad celular, la arquitectura del

citoesqueleto y la adhesión celular en la superficie de titanio con nanopartículas de plata, en el 2010 por Liao y Anchun.

En esta investigación la actividad antimicrobiana de la superficie de titanio con nanopartículas de plata fue probada contra *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, por medio de la aplicación del ensayo de recubrimiento de película (FAC), directamente incubando las células microbianas en la superficie de titanio con nanopartículas de plata y en la superficie de titanio pulido, exhibiendo una propiedad antibacteriana fuerte tras la incubación de 24 hrs, el 94,79% *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y 93% de las *Porphyromonas gingivales*, en suspensión fueron inhibidos en la superficie de titanio con nanopartículas de plata, así como se observó una reducción notable de la adhesión bacteriana en esta superficie de titanio con nanopartículas de plata. A través de la prueba de MTT, la virilidad de los fibroblastos gingivales humanos fueron evaluados después de 1,2,4,6,y 8 días de incubación, dando como resultados un aumento en su diámetro durante los primeros días alcanzando su punto máximo en el día sexto, seguido por una disminución en el día 8, mientras que en el examen de tinción fluorescente para la arquitectura del citoesqueleto, se muestra que estos fibroblastos exhibieron una forma fusiforme o poligonal, sugiriendo que la morfología de las células no se vió afectada por la superficie modificada. Así como los exámenes de microscopia electrónica de barrido muestran, que las células en la superficie modificada mantienen una arquitectura normal, lo que sugiere que las placas de titanio tratadas con nanopartículas de plata no muestran citotoxicidad detectable en los fibroblastos humanos gingivales. Se observó de igual manera, que a partir de las 3 horas después del cultivo, había comenzado a adherirse a la superficie de titanio, y ya después de 12 horas de cultivo, las células parecían formar contactos con los fibroblastos adyacentes y comenzaron a alinearse íntimamente, unidas a la superficie (Liao J, Anchun M, 2010).

3.19.-Citotoxicidad de Nanoparticulas de Plata

Madhumathi realizó pruebas de citotoxicidad por medio de la prueba de MTT donde puso a prueba andamios de quitina con nanopartículas de plata en un

medio de cultivo de fibroblastos de ratas, mostrando una citotoxicidad *in-vitro*, el afirmó que esta citotoxicidad es debida a las nanopartículas de plata presentes, pero si ésta puede tener algún efecto sobre la herida (*in vivo*) es dudosa. Existen estudios que han demostrado que las nanopartículas de plata que contiene los vendajes para heridas son *in-vitro* citotóxicos, mientras que *in vivo* muestra buena respuesta, y así concluye que, es incierto si esta citotoxicidad *in vitro* puede afectar *in- vivo* la respuesta curativa de la herida (ONG,S.Y 2008) (Madhumathi K. 2010)

Hipótesis

4 HIPÓTESIS

La deposición de nanopartículas de plata, sobre las superficies de las placas de titanio, exhiben propiedades antimicrobianas contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* y baja citotoxicidad.

Objetivos

5 OBJETIVOS

-Objetivos Generales

1- Evaluar las propiedades antimicrobianas y de citotoxicidad *in-vitro* de las nanopartículas de plata adheridas a las superficies de las placas de titanio.

-Objetivos Específicos:

- 1) Establecer el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata a diferentes concentraciones en las placas de titanio *in vitro* con la cepa bacteriana *Streptococo mutans*. (Au159 ATCC17040).
- 2) Analizar el efecto antimicrobiano de las distintas concentraciones de nanopartículas de plata en las placas de titanio *in vitro* de la cepa bacteriana *Porphyromona gingivalis virulenta* (Pg. W50).
- 3) Determinar la citotoxicidad *in vitro* de las distintas concentraciones de nanopartículas de plata en las placas de titanio .
- 4) Comparar las respuestas de las nanopartículas de plata a distintas concentraciones en las pruebas antimicrobianas y de citotoxicidad.
- 5) Comparar las respuestas de las nanopartículas de plata a distintas concentraciones con la clorhexidina tanto en la prueba de citotoxicidad como antimicrobiana

Materiales y Métodos

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 POBLACIÓN

En este estudio prospectivo experimental, longitudinal y comparativo se realizaron dos pruebas, que son las antimicrobianas y las de citotoxicidad, a través de 22 experimentos en 2 medios de cultivos bacterianos: *Porphyromona gingivalis* W50 y *Streptococcus mutans* ATCC7987. Se usaron 22 placas de titanio estériles de 9.0 mm de diámetro por 2mm de altura: 18 con deposición de nanopartículas a tres diferentes concentraciones (3 Subgrupos de 6 placas para cada una de las diferentes concentraciones: 6.06, 3.03 y 0.96 mg/ml); 2 sin nanopartículas de plata (grupo control); y 2 impregnadas con clorhexidina al 0.12% .

De igual manera se utilizó como línea celular las células mesenquimales de pulpa dental para la prueba de citotoxicidad. El tamaño de muestra y la metodología experimental en lo referente a la obtención de cultivos bacterianos se tomo con base en experiencia previa de investigación con cultivos bacterianos realizados por Liao J, Anchun M, Zhu Z, Quan Y. 2010; en su estudio titulado Antibacterial titanium plate deposited by silver nanoparticles exhibits cell compatibility.

Por las condiciones de la variable a evaluar del tipo cuantitativa (Halo de inhibición antibacterial) y una población infinita se estima el tamaño de la muestra con la aplicación de la siguiente fórmula general:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{e^2}$$

Para obtener el tamaño de la muestra se obtiene que:

$$n = \frac{(1.96)^2 (230)^2}{(66)^2}$$

De aquí se obtiene que el número total de piezas de estudio será de 22 placas de titanio que serán distribuidas conforme a los datos establecidos en el estudio consistiendo en 18 con disposición de nanopartículas y 4 sin nanopartículas de plata.

6.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Placas de titanio estériles de 9 mm diámetro por 2mm de altura impregnadas de acuerdo a la concentración específica la dispersión coloidal de CMC (Carboxi metil celuosa) y nanopartículas de plata.
- Placas de titanio estériles de 9 mm diámetro por 2mm de altura.
- Medio de cultivo (Agar sangre y Trypticaseina)
- Células mesenquimales de pulpa dental .
- Clorhexidina al 0.12% .

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Placas de titanio dañadas.
- Medio de cultivo contaminado (Agar sangre y Trypticaseina)
- Clorhexidina al 0.12% contaminada o en otra concentración

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Exposición al sol de la dispersión coloidal de CMC y nanopartículas de plata.
- Fracaso de inoculación de bacterias.
- Contaminación bacteriana.
- Cultivos caducados
- Fracaso en la siembra de las células.

6.3 CAPTACIÓN DE VARIABLES

- Halos de inhibición bacteriana
- Halos de inhibición de los controles
- Intensidad de Fluorescencia
- Micrografías SEM

6.4 DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Se adquirió la solución de Carboximetil celulosa (CMC) con nanopartículas de plata con concentración de sólidos totales de 6.06 mg/ml y concentración de nanopartículas de plata, [Ag] = 0.06 mg/mL; del Centro de Innovación y Desarrollo de Ingeniería y Tecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

De igual manera a través del Posgrado de Ortodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se obtuvieron los 22 placas de titanio-vanadio de 9 milímetros de diámetro por 2 mm de altura.

Las bacterias utilizadas en esta investigación, *Streptococcus mutans* y *Porphyromona gingivalis*, fueron obtenidas por medio de la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UOIE-CIDICS).

Se utilizó la línea celular de células madre de la pulpa dental de diente primarios, proporcionadas por Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UOIE-CIDICS).

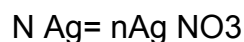
Metodología de solución de nanopartículas de plata

Según lo reporta el proveedor, la disolución de nanopartículas de plata, empleada en este trabajo de investigación, se obtuvo de la siguiente manera:

1. Se preparó una disolución stock de CMC(Carboximetil celulosa) con DS = 1.2 al 15 mg/mL.
2. Se agregaron 20 mL de disolución de CMC a un matraz de tres bocas y agitar vigorosamente a temperatura ambiente.
3. Se preparo una disolución de nitrato de plata (AgNO_3) al 0.482 mg/mL de la siguiente manera:
 - Se disolvio 96.4 mg AgNO_3 en agua desionizada y se aforo a 10 mL para obtener disolución de la sal a $[\text{AgNO}_3] = 9.64 \text{ mg/mL}$.
 - Se tomo 1 mL de esta disolución y se aforo 10 mL para obtener disolución de la sal a $[\text{AgNO}_3] = 0.964 \text{ mg/mL}$.
 - Se tomo 5 mL de esta disolución y se aforo a 10 mL para obtener disolución de la sal a $[\text{AgNO}_3] = 0.482 \text{ mg/mL}$.
4. Se agrego 10 mL de disolución de sal al $[\text{AgNO}_3] = 0.482 \text{ mg/mL}$, preparada en el paso anterior, al reactor con CMC y se incrementó la temperatura del medio a 90°C . La reacción de mantuvo en reflujo durante 24 hrs.
5. Y así se deajo enfriar la muestra resultante bajo condiciones ambiente y se aforo a 50 mL con agua desionizada para obtener una concentración $[\text{Ag}] = 0.06 \text{ mg/mL}$.
6. Finalmente se purifico durante 24 hrs utilizando en una membrana de diálisis (celulosa) en agua desionizada.

Siguiendo esta metodología se obtuvieron 3 mg de Ag con 300 mg de CMC.

Por medio del calculo siguiente;



Las características de dicha solución de CMC con nanopartículas de plata que usamos en dicho experimento son las mismas que las que se describe su autor. Reportando una distribución de tamaño de 19 nm con una desviación estándar de 7.9 nm. Para mayor referencia, esta dispersion coloidal es la denominada AgCMC2 en el artículo titulado: "Totally Ecofriendly Synthesis of Silver Nanoparticles From Aqueous Dissolutions of Polysaccharides", de M. A. Garza-Navarro y colaboradores, publicado en el International Journal of Polymer Science en 2013.

Metodología para la deposición de la disolución de CMC con nanopartículas de plata en las placas de titanio.

Las 22 placas de titanio previamente estériles, se dividieron en dos grupos, el grupo control que consto de 4 placas de titanio sin impregnar; y un segundo grupo experimental que consto de 18 placas de titanio impregnadas con nanopartículas de plata a tres concentraciones distintas. La impregnación de las placas se llevo acabo de la siguiente manera:

Las 18 placas de titanio se dividieron en 3 subgrupos cada uno de esos subgrupos contenia 6 discos de titanio, a los cuales se les coloco 200 μ L de la dispersión de carboximetil celulosa y nanopartículas de plata, de acuerdo a la concentración correspondiente de cada subgrupo. Posteriormente se introdujeron a un horno de calor seco a 50 – 60°C por un lapso de 24 hrs, de modo tal que estén completamente secos, para después usarse en los experimentos antimicrobianos.

Los subgrupos anteriormente mencionados son los siguientes:

Grupo Experimental

Subgrupo 1

Consto de 6 placas de titanio recubiertas de 200 μ L de dispersión de CMC con nanopartículas de plata a concentración de sólidos totales de **6.06 mg/mL** o [Ag]= 0.06 mg/mL (concentración al 100 % en peso de material).

Subgrupo 2

Compuesta por 6 placas de titanio recubiertas de 200 μ L de dispersión de CMC con nanopartículas de plata a concentración de sólidos totales de **3.03 mg/mL** o [Ag] = 0.03 mg/mL (concentración al 50 % en peso de material).

Subgrupo 3

Compuesta por 6 placas de titanio recubiertas de 200 μL de dispersión de CMC con nanopartículas de plata a concentración de sólidos totales de **0.96 mg/mL** o $[\text{Ag}] = 96 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$ (concentración al 16 % en peso de material).

Grupo control Positivo

Consto de 2 placas de titanio esteriles a las que se les impregno con 200 microlitros de Clorhexidina al 0.12% (Consepsis al 2%)

Grupo control Negativo

Consto de 2 placas de titanio esteriles sin deposición de algún material.

Metodología de la prueba Anti-microbiana

Tras 24 horas de la deposición de nanoparticulas de plata, de acuerdo a la concentración correspondiente de cada subgrupo, descrita anteriormente sobre los discos de titanio, se prosiguió a los experimentos antimicrobianos, llevados a cabo en el centro de investigación (CIDITS), donde se separaron 22 cajas de Petri, de las cuales, 11 cajas eran de tripticaseína de soya que correspondían a la cepa bacteriana *Streptococcus mutans* y 11 de agar sangre para la cepa bacteriana *Porphyromona gingivalis*.

A cada una de estas cajas se le colocó un disco de titanio impregnado de acuerdo a los subgrupos anteriormente mencionados. De tal manera que 9 cajas eran del grupo experimental, usando 3 cajas por concentración de nanoparticulas de plata, y 2 cajas del grupo control usando 1 caja para el control negativo y una para el control positivo.

De tal manera que los experimentos fueron de la siguiente manera:

Grupo Experimental: 18 cajas de Petri

Experimento Antimicrobiano con *Streptococcus mutans*

En nueve cajas de tripticaseína de soya se inocularon por medio de difusión, 1 mL de *Streptococcus mutans* ATCC7987 logrando una capa homogénea.

Seguido de esto se colocó individualmente la placa de titanio recubierta con la concentración descrita anteriormente de los subgrupos 1(100%), 2(50%) y 3(16%). Para posteriormente incubarlos a 37 °C durante 16 horas, y finalmente se realizó la medición del halo de inhibición. Este procedimiento se repitió tres veces

Experimento Antimicrobiano con *Porphyromona gingivalis*

Nueve cajas de agar sangre donde se inocularon por medio de difusión la cantidad de 1 mL homogéneamente de *Porphyromona gingivalis*, W50. Después se colocaron individualmente las placa de titanio recubierta con la concentración descrita anteriormente de los subgrupos subgrupos 1(100%), 2(50%) y 3(16%). Para posteriormente incubarlos en un ambiente anaeróbico a 37 °C durante 72 horas, y finalmente se realizo la medición del halo de inhibición. Dicho procedimiento se repitió tres veces

Grupo Control: 4 cajas de Petri

Control negativo

En una caja de Petri con tripticaseina de soya se inoculo por medio de difusión, 1 mL de *Streptococcus mutans* ATCC7987. Seguido de esto, se colocó una placa de titanio esteril sin nanopartículas de plata, para posteriormente incubarla a 37 °C durante 16 horas, y finalmente se realiza la medición del halo de inhibición.

Control negativo

En una caja de Petri de agar sangre se inoculo por medio de difusión, 1ml de *Porphyromona gingivalis virulenta* W83. Seguido de esto, se colocó una placa de titanio sin nanopartículas de plata, para posteriormente incubarlos en un ambiente anaeróbica 37 °C durante 72 horas, y finalmente se realizo la medición del halo de inhibición.

Control Positivo

En una caja de Petri con tripticaseina de soya se inoculo por medio de difusión, 1ml de *Streptococcus mutans* ATCC7987. Seguido de esto, se colocó una

placa de titanio esteril impregnada con 200 microlitros de digluconato de clorhexidina peroxidin 0.12%, para posteriormente incubarla a 37 °C durante 16 horas, y finalmente se realiza la medición del halo de inhibición.

Control Positivo

En una caja de Petri de agar sangre se inoculo por medio de difusión, 1ml de *Porphyromona gingivalis virulenta* W83. Seguido de esto, se coloco una placa de titanio esteril impregnada con 200 microlitros de digluconato de clorhexidina peroxidin al 0.12%, para posteriormente incubarlos en un ambiente anaeróbic a 37 °C durante 72 horas, y finalmente se realizo la medición del halo de inhibición.

Los resultados obtenidos tanto en el grupo experimental como control se recaudaran individualmente para posteriormente llenar la tabla de resultados correspondiente.

Metodología para la prueba de Citotoxicidad

Para evaluar los efectos citotóxicos de las nanoparticulas de plata a distintas concentraciones se emplearon, como medio celular, células mesenquimales de pulpa dental. Durante 24 hrs se cultivaron dichas células en una incubadora hasta obtener una confluencia celular de 15 mil células, las cuales se evaluaron por medio de la cámara de Neubauer.

Se uso una placa de 96 pocillos (12 x 8) de los cuales se usaron 15 pozos, y por cada pozo se colocaron 200 µL, conteniendo cada uno 15 mil células derivadas de la pulpa dental; esto dio un total del 6 mL de medio de células. Se incubaron 24 hrs para posteriormente colocar las sustancias a evaluar de la siguiente manera:

Grupo experimental: 15 pocillos

Grupo 1: se colocaron 160 µL del medio de las células mesenquimales en 3 pocillos junto con 40 µL de la dispersión de nanopartículas de plata a una concentración de 6.06 mg/mL, que equivale a la concentración del 100% usada en las pruebas antimicrobianas

Grupo 2 : se tomarón 180 microlitros del medio de las células en 3 pocillos de las placas y se añadió 20 μL de la dispersión de nanopartículas de plata a una concentración de 3.03 mg/mL, que equivale a la concentración del 50 % usada en las pruebas antimicrobianas.

Grupo 3 : se incorporaron 180 μL del medio de las células en 3 pocillos junto con 20 μL de la dispersión de nanopartículas de plata a una concentración de 96×10^{-3} mg/mL que equivale a la concentración al 16% usada en las pruebas antimicrobianas.

Control negativo: se añade 180 μL del medio de las células sin ninguna solución en 3 pocillos y 20 μL de agua desionizada.

Control positivo : se colocaron 180 μL del medio de las células en 3 pocillos junto con 20 μL de digluconato de clorhexidina al 0.12% (consepsis 2%).

El montaje del experimento se realizó colocando primero el medio de cultivo de los fibroblastos, que fue de 160 microlitros, seguida de los cierto volumen de agua destilada; y finalmente de la molecula experimental. Cada una de las sustancias a evaluar, es decir el conjunto de las células junto con las moléculas de los experimentos, se mantiene durante 24 hrs en la incubadora para posteriormente lavar con solución de PBS 3 veces y poder colocar el compuesto fluorescente. Se colocó 100 μL del compuesto fluorescente y se deja durante 30 minutos en la incubadora, para posteriormente hacer el método de fluorescencia con un aparato Glomax- Multi Detection System; y se realizó la lectura de la intensidad de fluorescencia y absorbancia.

Se calcularon los valores promedios y desviación estándar de la lectura de fluorescencia emitida por las células de las celdillas correspondientes a cada concentración de Nanoparticulas de plata, y controles positivos y negativos.

VI 5. METODO ESTADISTICO

Prueba Antimicrobiana

Todos los datos se analizarón utilizando la versión 18.0 del Software SPSS para Windows.

A cada grupo se comparó respectivamente, utilizando la prueba *t* de Student independiente. Para este análisis estadístico, se utilizó un límite de confianza del 95%, de manera que el valor $p =$ inferior o igual a 0,05 ($p \leq 0.05$) fue considerado estadísticamente significativos. Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió tres veces por separado. (Tabla. 3,4,5, 6,7,8).

Así también con el propósito de cumplir los objetivos mencionados, el análisis que se realizó en las pruebas antimicrobianas fue un ANOVA (análisis de varianza) para ver si hay diferencia en la respuesta debido a la concentración, para *Streptococcus mutans* (Tabla. 9 y 10) y para *Porphyromona gingivalis* (Tabla. 11 y 12). Anexo 2.

Del mismo modo se realizó la prueba de Tukey para establecer la comparación de las tres concentraciones. (Fig. 4y 5) (Tabla. 13 y 14). Anexo 2.

Para estos últimos análisis estadísticos, se utilizó un límite de confianza del 95%, de manera que valores de ($p < 0.01$) fueron considerados estadísticamente significativos

Prueba Citotoxicidad

En esta prueba cada ensayo se realizó por triplicado. (Tabla 15). Anexo 2.

Así también con el propósito de cumplir los objetivos mencionados, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para ver si existe diferencia en la viabilidad celular con respecto a la concentración. (Tabla 15,17,19,21) Al igual se usó la Prueba de T de Dunnett para comparar dichas concentraciones con los controles tanto positivos como negativos. (Tabla 18 y 20) Anexo 2.

Del mismo modo se realizó la prueba de Tukey para establecer la comparación de las tres concentraciones. (Tabla. 16 y 22). Anexo 2.

Para estos últimos análisis estadísticos, se utilizó un límite de confianza del 95%, de manera que valores de $p < 0.01$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

7 RESULTADOS

Durante el proceso de preparación de la deposición de nano partículas de plata a la superficie de las placas de titanio se observo un cambio notable después de las 24 horas observando un cambio notable en el color de la capa de titanio que se convirtió en un color bronce después de haber sido impregnado con la solución CMC de nano partículas de plata. Observando que dicho color era más fuerte conforme aumentaba la concentración, observándose una ligera capa entre dorada y bronce con la concentración del 16% de nano partículas de plata y una capa mucho más dorada al 50% y 100% (Figura 1 Anexo 1).

Al examinar las micrografías por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) encontramos que las placas de titanio con nanopartículas de plata se hallaban distribuidas de manera homogénea alrededor de toda la película de CMC depositadas en la superficie de titanio. De igual manera podemos observar como se ve la placa de titanio sin nanopartículas de plata observando varias micrografías a diferentes amplitudes como se observa en la Figura 1.2 (Anexo 1).

PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

Se observo que las Nanopartículas de plata al impregnarlas en los discos de titanio y colocarlos en contacto con las cepas bacterianas, mostraban propiedades antimicrobianas ya que en ambos experimentos, con dichas cepas, hubo un halo de inhibición alrededor del disco de titanio. Se observó que tuvo un mayor efecto inhibitorio sobre los bacilos gram (-) anaerobios (*Porphyromona Gingivalis*) a comparación de los cocos gram (+) aerobios (*Streptococo Mutans*) (Figura 2) (Figura 3).

Al comparar los distintos porcentajes de las concentraciones de nanopartículas de plata, se observo en todos los experimentos que a medida que incrementaba la concentración de nanopartículas de plata, se incrementaba el halo de inhibición bacteriana, reportándose un mayor halo de inhibición bacteriana en una concentración del 100% y así sucesivamente. A continuación se muestran los resultados obtenidos en ambas pruebas antimicrobianas tanto con *Streptococo Mutans* como con *Porphyromona Gingivalis* .(Tabla 1 y 2, Anexo 2).

Prueba antimicrobiana con *Streptococo Mutans*

Tras la espera de 24 horas de incubación después de cultivada la cepa bacteriana de *Streptococo Mutans*, en placas con una concentración del 16% se observó un halo de inhibición de un promedio de 1.08 mm de diámetro, mientras que con una concentración del 50% se observó un promedio de 1.18 mm de diámetro; y con el 100% era de 1.25 mm de inhibición bacteriana alrededor del disco . (Ver Tabla 1. Anexo 2) .

Con lo que de acuerdo al análisis de varianza mostrado en la Tabla 9 y 10 (Anexo 2) observamos que el valor de $F= 15.200$, tiene una significancia de 0.004, ($p < 0.01$) indicando que existe una alta diferencia significativa entre las diferentes medidas de halo de inhibición, entre las tres concentraciones distintas de nanopartículas de plata. Sin embargo en la Prueba de Turkey observamos que los valores entre el 50% y 100% no existe una gran diferencia, lo cual se puede corroborar en la Gráfica 1 (Anexo1) (Tabla 13 Anexo 2) . estableciendo los resultados que no son muy distintos entre ambas concentraciones a comparación del 16% con *Streptococo Mutans*.

Al comparar los distintos resultados entre las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, observamos que había una inhibición bacteriana mayor a una concentración del 50% en comparación con el 16% lo que dio una alta diferencia estadísticamente significativa $p=0.0132$ ($p \leq 0.05$) entre ambas concentraciones de nano partículas de plata (Ver Tabla 3. Anexo 2) .

En la misma prueba antimicrobiana de *Streptococo Mutans* se encontró mayor halo de inhibición a una concentración del 100% en comparación con el 16% lo cual marcaba una diferencia estadísticamente significativa $p=0.0074$ ($p \leq 0.05$) entre ambas concentraciones de nanopartículas de plata (Ver Tabla 4 Anexo 2) .

Sin embargo al comparar los resultados de las propiedades antimicrobianas de la concentración de nanopartículas de plata del 50% con 100%, se observó un mayor halo de inhibición en esta última, habiendo una diferencia estadísticamente significativa $p= 0.0074$ ($p \leq 0.05$) en la prueba con

Streptococo Mutans (Ver Tabla 5. Anexo 2).

Prueba antimicrobiana con *Porphyromona Gingivalis*

Los resultados de las pruebas antimicrobianas con la cepa bacteriana *Porphyromona Gingivalis* mostraron que a una concentración del 16% de nano partículas de plata mostraba un halo de inhibición de 1.13 mm de diámetro mientras que al 50% este era de 1.34 mm de diámetro y al 100% había una inhibición bacteriana de 1.62mm de diámetro. (Ver Tabla 2 Anexo 2) .

Mostrado en el análisis de varianza que dicha diferencia tiene un valor de $F=138.731$ el cual tiene una significancia de 0.000 ($P < 0.01$) Indicando que existe una alta diferencia significativa entre las diferentes medidas de halo de inhibición, entre las diferentes concentraciones. (Tabla 11y 12 Anexo 2) . Lo que lo corrobora la prueba de Turkey al observar la diferencia estadísticamente significativa entre las tres concentraciones lo que se puede ver en la Gráfica 2 (Anexo 1) y Tabla 14(Anexo 2) .

En la prueba antimicrobiana de *Porphyromona Gingivalis* se encontró una inhibición bacteriana mayor a una concentración del 50% de nano partículas de plata en comparación con el 16% lo que reflejo una diferencia estadísticamente significativa $p= 0.0028$ ($p \leq 0.05$) entre ambas concentraciones de nano partículas de plata (Ver Tabla 6. Anexo 2) .

En la misma prueba antimicrobiana de *Porphyromona Gingivalis* se encontró mayor halo de inhibición a una concentración del 100% en comparación con el 16% lo cual marcaba una diferencia estadísticamente significativa $p= 2.389E-05$ ($p \leq 0.05$) entre ambas concentraciones de nanopartículas de plata (Ver Tabla 7 Anexo 2) .

Al comparar los resultados de las propiedades antimicrobianas de la concentración de nano partículas de plata del 50% con 100%, se observo mayor halo de inhibición en esta ultima, sin embargo no era una diferencia estadísticamente significativa $p= 0.9480$ ($p \leq 0.05$) en la prueba con *Porphyromona Gingivalis* (Ver Tabla 8. Anexo 2).

Sin embargo al comparar los resultados de las nano partículas de plata con el control positivo que es la clorhexidina al 0.12% se observa que hay un halo de inhibición bacteriana mucho mayor en esta ultima a comparación de las nano partículas de plata tanto con *Streptococos Mutans* como con *Porphyromona Gingivalis*.

Es decir con *Porphyromona gingivalis* las Nanopartículas de plata al 100% tenían un promedio de halo de inhibición de 1.62mm mientras que con la Clorhexidina al 0.12% era de 2.3mm habiendo una diferencia de 0.68mm. De la misma manera sucedió con *Streptococos Mutans* observando que NAg 100% tenia un promedio de 1.25mm y la Clorhexidina al 0.12% era de 1.7mm habiendo una diferencia de 0.45mm.

Lo anterior nos mostró que las nanopartículas de plata tienen un comportamiento antimicrobiano, inhibiendo el crecimiento bacteriano alrededor de las placas de titanio en cualquiera de sus concentraciones, sin embargo no es superior a la solución de digluconato de clorhexidina (perioxidin) al 0.12% que hay un halo mayor en el, siendo el bactericida por excelencia (Ver Tabla 1 y 2. Anexo 2).

CITOTOXICIDAD

En la gráfica 3-A (Anexo 1) se puede observar que hubo una reducción porcentual significativa en la viabilidad celular al aplicar la solución de Nanopartículas de plata, la cual se acentuó al aumentar la concentración de la misma. Esto indica que a medida de que se incremente la concentración de nanopartículas de plata, disminuye la probabilidad de supervivencia celular. Observando una alta diferencia significativa entre las medidas de citotoxicidad entre los diferentes grupos experimentales. (Tabla 15 Anexo 2).

De la misma forma se puede observar que la cantidad de células vivas disminuye con el Digluconato de Clorhexidina al 0.12% en la cual fueron sumergidas. Observando que solo el 62% de estas células presentaron viabilidad, haciendo mención con esto de la toxicidad del mismo (Gráfica 3-B (Anexo 1)).

Mientras que en la Gráfica 3-A (Anexo 1) se aprecia una reducción significativa en el número de células madre mesenquimales de pulpa dental vivas utilizando Nanopartículas de plata a una concentración del 100%, observando que solo el 4% de las células mesenquimales se encontraban viables. (Gráfica 3-B Anexo1) Haciendo notar con ello su poder cito-tóxico a dicha concentración.

Del mismo modo al observar las gráficas, los resultados parecen ser similares con la concentración al 50% de nanopartículas de plata observando claramente que la citotoxicidad era ligeramente mayor que la del 100% sobre las células vivas, dando como resultado el 3.99% de células viables. Acentuando con esto su alto grado de citotoxicidad. (Gráfica 3-A y 3-B Anexo1).

Sin Embargo en los resultados se aprecia que no hubo una reducción porcentual significativa en la viabilidad celular al aplicar la solución de Nanopartículas de Plata al 16%, encontrándose un 95% de células viables, lo que prueba su bajo grado de Citotoxicidad. (Gráfica 3-B Anexo1).

Al comparar dicha concentración con el Digluconato de Clorhexidina al 0.12% podemos observar que las nanopartículas de plata al 16% producen un menor efecto cito-tóxico teniendo mayor células viables. Mostrando una diferencia estadística entre ambas Tabla 16 (Anexo 2).

Por lo tanto la gráfica 3-A (Anexo 1) Establece la comparación en la viabilidad celular entre el Digluconato de Clorhexidina al 0.12% y las diferentes concentraciones de Nanopartículas de plata. Observando de la misma manera que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las 3 concentraciones y la clorhexidina teniendo una significancia de 0.000 ($p < 0.01$). (Tabla 17 y 20 Anexo 2).

Al comparar la toxicidad sobre las células madre mesenquimales de pulpa dental con las 3 distintas concentraciones del 100% , 50% y 16% de nanopartículas de plata contra el total de células es decir el control negativo podemos observar que efectivamente son tóxicas teniendo una significancia de 0.000 ($p < 0.01$), que indica que hay una alta diferencia significativa entre las medias de las 3 concentraciones y el control negativo como se observa en la Tabla 19 y 18 Anexo 2 .

Demostrando que las nanopartículas de plata son significativamente más tóxicas a concentraciones muy por arriba del 16% y sobre el Digluconato de Clorhexidina al 0.12% ya que hubo una reducción porcentual en la viabilidad celular utilizando nanopartículas de plata a mayor concentración (50 y 100%), sin embargo el grado de toxicidad entre estas dos es muy similar, no habiendo con ello una diferencia estadísticamente significativa entre la muerte celular que provocan ambas como se observa en Tabla 16 Anexo 2.

Discusión

8. DISCUSIÓN

Propiedades Antimicrobianas

Los mini-implantes son una poderosa ayuda para el ortodoncista en la resolución de las maloclusiones difíciles, pero el fracaso de estos micro-implantes puede retrasar el tiempo del tratamiento.

Su superficie, influencia de manera importante la adhesión bacteriana y de esta forma también inciden en la presencia de peri-implantitis. Los colonizadores tempranos como los *Streptococos* crean un ambiente indicado para los colonizadores tardíos como la *Porphyromonas gingivalis*. (Karthikeyan Subramani, y col, 2009).

Los colonizadores microbianos iniciales en los mini-implantes con éxito de osteointegración, prevalecen los Gram positivos facultativos que se establecen después de la implantación, identificándose en el 80% a cocos gram positivos facultativos. Sin embargo el 41% de los implantes con fracasos, muestra una flora de bacilos gram negativos anaerobios.

Existiendo mayor presencia de Gram negativos anaerobios en los sitios con pérdida ósea o bien con supuración (A. Mombelli 1993). Es por ello la importancia de poder analizar las cepas bacterianas *Streptococos mutans* (cocos gram positivos facultativos) y *Porphyromonas gingivalis* (bacilos gram negativos anaerobios), las cuales se consideraron adecuadas en este estudio para evaluar las propiedades antimicrobianas con las nanopartículas de plata, para poder ver la interacción in-vitro con dichas bacterias, que son las que están en contacto con el mini-implante, y las causantes de la peri-implantitis. Observando que efectivamente existe un poder antimicrobiano significativo en ambas.

Las diferencias entre las distintas especies puede influenciar en la susceptibilidad de los agentes antimicrobianos, las bacterias Gram positivas contienen 3-20 veces más peptidoglicanos que las Gram negativas. Los peptidoglicanos presentan una carga negativa y ellos probablemente ciegan alguna porción de los iones de plata, por consiguiente, las bacterias Gram

positivas son menos susceptibles a ellos (Douglas M,R 2009). Esto explica los resultados del presente estudio observando que al impregnar las distintas concentraciones de nanopartículas de plata en los discos de titanio y colocarlos en contacto con las cepas bacterianas, mostraban propiedades antimicrobianas, sin embargo había un mayor efecto inhibitorio sobre los bacilos gram (-) anaerobios (*Porphyromona Gingivalis*) a comparación de los cocos gram (+) aerobios (*Streptococo Mutans*). Mostrando que las nanopartículas de plata, tienen propiedades antimicrobianas más pronunciadas contra organismos gram negativos que gram-positivos.

Así Garcia Contreras también reconoce dicha susceptibilidad, mencionando que las nanopartículas de plata tienen una actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram negativas, generando unas perforaciones en forma de huecos en la pared bacteriana, haciendo que la morfología de la membrana cambie, incrementando su capacidad permeable y facilitando la muerte celular. (García Contreras. R. 2011).

De igual manera Madhumathi, realizó pruebas antimicrobianas contra *S. aureus* y *E. coli*, poniendo de manifiesto que hay una actividad antimicrobiana eficiente principalmente sobre *E. coli* (gram negativa) mostrando mayor susceptibilidad en las bacterias gram negativas a diferencia de las gram positivas, concordando con este estudio. (Madhumathi K. 2010).

Alude de igual manera que los autores anteriores que esto se debe posiblemente a que la bacteria gram positiva, está cubierta por una membrana de peptidoglicanos, la cual limita la penetración de las nanopartículas de plata. Observó también que si se incrementaba la concentración de nanopartículas de plata, la zona de inhibición incrementaba, Lo cual de igual manera sucedió con este estudio observando que existe una alta diferencia significativa entre los halos de inhibición de las tres concentraciones distintas de nanopartículas de plata, estableciendo que dicho halo se incrementa a medida que la concentración sea mayor observando esto tanto con *Streptococo Mutans* y *Porphyromona Gingivalis*.

De igual manera que el presente estudio, Liao y colaboradores al observar que

la formación de biofilm, es uno de los fracasos más comunes de los mini implantes, desarrollaron una superficie de titanio pulido e impregnaron nanopartículas de plata para probar las propiedades antimicrobianas. Evaluando dicha superficie contra, bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y bacterias Gram positivas como el *Staphylococcus aureus*, exhibiendo propiedades antibacterianas fuertes, dando como resultado una inhibición del 94% en *Staphylococcus aureus* y más del 95% de *Escherichia Coli*, lo que concuerda con nuestro estudio proporcionando propiedades antimicrobianas mayores en los gram negativos.

Por lo que este estudio al igual que nuestra investigación muestra así que la superficie de titanio con nanopartículas de plata, inhibe significativamente el crecimiento de dichas bacterias a comparación de la superficie de titanio pulido. Por lo que se llegó a la conclusión de que la superficie de titanio con nanopartículas de plata, reduce el riesgo de la colonización bacteriana. (Liao J, Zhu Zhimin,2010).

Liao y Anchun, evaluarón del mismo modo la actividad antimicrobiana de la superficie de titanio con nanopartículas de plata contra *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, directamente incubando las bacterias en la superficie de titanio con nanopartículas de plata y en la superficie de titanio pulido, exhibiendo una propiedad antibacteriana.

Observando que el 94,79% *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y 93% de las *Porphyromonas gingivales*, en suspensión, fueron inhibidos en la superficie de titanio con nanopartículas de plata, así como se observó una reducción notable de la adhesión bacteriana en esta superficie de titanio con nanopartículas de plata. (Liao J, Anchun M, 2010).

En este sentido, en el presente estudio se cubrieron las placas de titanio con tres concentraciones distintas de Nanopartículas de plata al 100%, 50% y 16% partiendo de una concentración stock total de 6.06 mg/ml (Ag= 0.06 mg/ml), observando en cada una de ellas propiedades antimicrobianas sin embargo al comparar las propiedades microbianas y su interacción con las tres concentraciones de nanopartículas de plata en la prueba con *Streptococo*

Mutans se encontró un mayor halo de inhibición a una concentración del 100% en comparación con el 16% siendo estadísticamente significativo ($P=0.0074$) de igual manera sucedió en comparación con el 50% y 16% dando una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0132$) entre ambas. Del mismo modo sucedió al comparar dichas propiedades entre 50% con 100% de NAg, se observo mayor halo de inhibición en esta ultima, sin embargo no era una diferencia estadísticamente significativa.

Mientras que con *Porphyromona Gingivalis* se encontró una inhibición bacteriana mayor a una concentración del 50% en comparación con el 16% siendo una diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.0028$), De igual manera sucedió entre el 100% y el 16% marcando una diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo al comparar los resultados de las propiedades antimicrobianas del 50% con 100%, se observo mayor halo de inhibición en esta ultima, pero no era una diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.9480$).

Sin embargo al comparar dichas propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata en los discos de titanio con la Clorhexidina al 0.12%, siendo un bactericida usado por excelencia en la actualidad para prevenir dicho fracaso en los mini-implantes, se observo que hay un halo de inhibición bacteriana mucho mayor en esta ultima a comparación de cualquier concentración de las nano partículas de plata.

Por lo que los resultados de esta investigación coinciden con el estudio de Mc Bain y colaboradores demostrando la susceptibilidad de diferentes bacterianas a la Clorhexidina esta susceptibilidad varia entre una cepa y otra , Siendo las más susceptibles las bacterias anaerobias gram-negativas *Prevotella Nigrescens*, *Porphyromona Gingivalis* seguidas de *Streptococos Mutans* y *S sanguis*. (Mc Bain 2003). Encontrandose en este estudio mayor susceptibilidad de la clorhexidina con los gram negativos seguido de los positivos.

De acuerdo a varios autores y a los resultados encontrados en este estudio se puede considerar a las nanopartículas de plata como un agente antimicrobiano que actúa inhibiendo el crecimiento bacteriano alrededor de las placas de titanio

y que la solución de digluconato de clorhexidina al 0.12% es un bactericida por excelencia ya que hay un halo significativamente mayor en los discos.

Por otro lado existen varios estudios que hacen mención de la relación inversa entre el tamaño de las nanopartículas de plata y la actividad antimicrobiana, por lo que Morones en su estudio al evaluar las propiedades antimicrobianas de dichas nanopartículas con un rango de 1 a 100 nm, demuestra que las nanopartículas en el rango de 1 a 10 nanómetros tienen la mayor actividad biocida contra las bacterias Gram-negativas (Morones 2005).

Siendo que en el presente estudio usamos nanopartículas de plata en las tres distintas concentraciones con una misma distribución de tamaño de 19 nm, con una desviación de 7.9nm, representando un mayor tamaño de nanopartículas al reportado por Morones, explicando con ello los resultados antimicrobianos de ambas cepas bacterianas estando por debajo de la clorhexidina al 0.12%. Concluyendo con ello que si se aumenta el tamaño de dicha nanopartícula obtendríamos mayores resultados antimicrobianos, ya que el poder antimicrobiano es dependiente del tamaño, sin embargo podría tener repercusión en la toxicidad de la misma.

Liu y colaboradores demostraron de igual manera que las nanopartículas de plata de menor tamaño poseen una mayor actividad antibacteriana contra las bacteria de *E. coli* y *Streptococcus aureus*, donde se observa que esta actividad antimicrobiana, se reducía con el aumento de tamaño de las nanopartículas de plata. (Liu HL 2010).

Por otra parte en cuanto a la deposición de nanopartículas de plata, en este estudio se observó que al colocar la solución CMC con Nanopartículas de plata se puede ver un cambio de color en las placas de titanio observando con ello un color bronce mismo al reportado en el artículo de Liao y Zhu. Sin embargo se hace mas fuerte la película color bronce, conforme aumente la concentración.

A diferencia de las micrografías de SEM mostradas en el estudio de Liao y Zhu donde demuestran nanopartículas de plata escasamente depositadas en los discos de titanio, este estudio muestra micrografías del microscopio electrónico de barrido SEM con diferentes ampliaciones, observando una distribución

mayor de nanopartículas de plata alrededor de la película de CMC observándose de manera homogénea por toda la placa de titanio en distintas ampliaciones (Figura 1.2).

Propiedades Citotoxicidad

Liao y Anchun realizaron pruebas de citotoxicidad con nanopartículas de plata en los fibroblastos gingivales humanos, dando como resultado un aumento en su diámetro durante los primeros días alcanzando su punto máximo en el día sexto, seguido por una disminución en el día 8. Estos fibroblastos exhibieron una forma fusiforme o poligonal, sugiriendo que la morfología de las células no se vió afectada por la superficie modificada.

Así como los exámenes de microscopia electrónica de barrido muestran, que las células en la superficie modificada mantienen una arquitectura normal, lo que sugiere que las placas de titanio tratadas con nanopartículas de plata no muestran citotoxicidad detectable en los fibroblastos humanos gingivales. Se observó de igual manera, que a partir de las 3 horas después del cultivo, había comenzado a adherirse a la superficie de titanio, y ya después de 12 horas de cultivo, las células parecían formar contactos con los fibroblastos adyacentes y comenzaron a alinearse íntimamente, unidas a la superficie (Liao J, Anchun M, 2010).

El presente estudio concuerda, de igual manera con los resultados de Liao sobre la baja toxicidad celular de las nanopartículas de plata. Sin embargo en esta investigación se uso como medio de cultivo células mesenquimales de pulpa dental de dientes primarios y se evaluo la citotoxicidad por medio de intensidad de fluorescencia y no de absorbancia con el ensayo de MTT como lo hace Liao, lo cual lo hace un estudio más específico mostrando una mayor intensidad de fluorescencia a la concentración del 16% (0.192mg) de NAg, dicha intensidad equivale a la cantidad de células vivas representada por un 95%, Mientras que hubo una menor cantidad de fluorescencia a las concentraciones del 50 % y 100% de nanopartículas de plata siendo mas citotóxicas dichas concentraciones.

Douglas menciona que las concentraciones de nanopartículas de plata de 5 μm /

ml, inducen a necrosis o apoptosis de células madre espermatozonales en ratones, de igual manera dice que la toxicidad es dependiente de la concentración (Douglas R.M. 2005), Esto coincide con los resultados encontrados en esta investigación, observando una citotoxicidad en función de la concentración es decir a mayor concentración de nanopartículas de plata mayor citotoxicidad.

Apresiasi que la mayor citotoxicidad en células madre mesenquimales de pulpa dental fue encontrada a concentraciones a partir del 50% y 100% que equivalen a 6.06 $\mu\text{m}/\text{ml}$ y a 12.12 $\mu\text{m}/\text{ml}$ respectivamente, lo cual esta por encima de la cantidad mencionada por el autor como tóxica (5 $\mu\text{m}/\text{ml}$), mientras que las nanopartículas al 16% no presentaron citotoxicidad ya que se trataba de una concentración de 1.92 $\mu\text{m}/\text{ml}$ es decir por debajo de la que menciona Douglas, lo cual explica la viabilidad de esta concentración .

De igual manera Liu acotó también que las nanopartículas de plata de tamaños más pequeños, presentan una alta citotoxicidad a mayores concentraciones. (Liu HL 2010). Lo que concuerda con esta investigación observando dicha dependencia entre la concentración y la citotoxicidad.

Ahora al comparar las concentraciones de nanopartículas de plata, del 50% y 100% se puede notar que tienen resultados muy similares, tanto en su poder antimicrobiano presentando un halo de inhibición bacteriano similar como en la citotoxicidad que provocan dando una viabilidad de menos del 4%, es decir no hay una diferencia estadísticamente significativa entre ambas concentraciones, lo que nos hace considerar la posibilidad de que las células se encuentren saturadas, con el 50% de la concentración de nanopartículas de plata, lo que hace que sus receptores no puedan recibir más sustratos, es decir más nanopartículas, explicando con ello el porque de la similaridad de los resultados en la prueba de citotoxicidad, lo mismo sucede en las pruebas antimicrobianas con ambas bacterias sin embargo es más leve la similaridad de los resultados, al presentado por la citotoxicidad.

En la actualidad se han descrito distintos procedimientos que consisten en depositar sobre la superficie de los implantes distintos materiales que favorecen

la integración de ellos, aumentando la estabilidad y proporcionando efectos antimicrobianos, por lo que de acuerdo con las propiedades antimicrobianas y baja citotoxicidad de las nanopartículas de plata descritas en este estudio, esto puede ser posible, sin embargo es necesaria la investigación de dichas nanopartículas, pero ahora con procedimientos in-vivo.

Ya que dichos beneficios de la utilización de estos productos de tamaño nanométrico en las distintas aplicaciones médicas pueden ser desafiados por las preocupaciones de sus interacciones en el ser vivo ya que no se conoce mucho sobre sus mecanismos de acción, absorción, distribución y propiedades tóxicas.

En general los resultados de este estudio comprueban que las nanopartículas de plata tienen propiedades antimicrobianas como una alta viabilidad celular a una concentración del 16%. Pudiendo llegar a ser una buena opción de revestimiento, obteniendo materiales no tóxicos capaces de tener una liberación dirigida y sostenida de plata bactericida en el lugar de implantación, sin embargo se requiere de mayor investigación con respecto a su toxicidad en los sistemas biológicos, para así poder ser usadas en áreas de la salud.

Conclusiones

9. CONCLUSIÓN

Al observar los resultados obtenidos y analizar los mismos se formularon la siguientes conclusiones:

- 1) Se confirma la hipótesis, al haber comprobado que la deposición de nanopartículas de plata, sobre las superficies de las placas de titanio, exhiben propiedades antimicrobianas contra ambas cepas bacterianas *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* y se observo una baja citotoxicidad de las nanopartículas de plata a una concentración del 16% (0.96 mg/ml), observando viabilidad en el 95% de las células mesenquimales de la pulpa dental. Sin embargo existe una de citotoxicidad a concentraciones por arriba del 50% (3.03 mg/ml).
- 2) Se establece el efecto antimicrobiano de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en las placas de titanio con la cepa bacteriana *Streptococo mutans*, encontrando mayores propiedades antimicrobianas a mayor concentración.
- 3) Existe un efecto antimicrobiano en las tres concentraciones distintas de nanopartículas de plata con la cepa bacteriana *Porphyromona gingivalis*, encontrando mayores propiedades antimicrobianas a mayor concentración.
- 4) Las nanopartículas de plata tienen mayor afinidad por las gram negativas *Porphyromona gingivalis* presentando halos de inhibición superiores a los de *Streptococo mutans* en todas sus concentraciones, y esto se puede deber probablemente a la morfología de las bacterias.
- 5) Se determino una citotoxicidad in vitro en las tres concentraciones de nanopartículas de plata, Sin embargo la concentración del 16%

presento una viabilidad en el 95% de sus células. Lo que nos demuestra que las nanopartículas de plata no son citotóxicas a esta concentración, y da pie a poder jugar con concentraciones intermedias entre el 50% y el 16%.

- 6) Al establecer la comparación entre los dos productos se demostró que la clorhexidina fue más citotóxica que las nanopartículas de plata de menor concentración, de igual manera la clorhexidina tiene un mayor poder antimicrobiano sobre cualquier concentración de nanopartículas de plata.

- 7) De acuerdo a estos resultados la concentración de nanopartículas de plata es dependiente de las propiedades antimicrobianas y de la citotoxicidad, Es decir a mayor concentración mayor efecto antimicrobiano y mayor citotoxicidad.

Referencias Bibliográficas

10 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Allaker RP; 2010; **The use of nanoparticles to control oral biofilm formation.** J Dent Res.;89(11):1175-86.
2. Asharani PV, Hande MP, Valiyaveetil S.BM. **2009 Anti-proliferative activity of silver nanoparticles.** C Cell Biol. 17;10:65.PMID: 19761582
3. ATCC 2001; **MTT Cell proliferation Assay**_Instructions Catalog Numbre 30-1010k Store at; 4 C PAG 1-6.
4. Ata-Ali J, Candel-Marti ME, Flichy-Fernández AJ, Peñarrocha-Oltra D, Balaguer-Martinez JF, Peñarrocha Diago M. 2011;**Peri-implantitis: associated microbiota and treatment.** Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 1;16(7):e937-43.
5. 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**;RETEL Revista de toxologia en linea ; Pag 52-40
6. Banu S. Zolnik, África González Fernández, Nakissa Sadrieh y Marina A. Dobrovolskaia98 2010; **Nanopartículas y el sistema inmunológico** **Endocrinology**, 151 (2) : 458-465
7. Douglas M R, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. 2009; **The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver.** Int J Antimicrob Agents.34(2):103-1

8. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P 1998; **Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants I Success criteria and epidemiology** Eur J Oral Sci;106(1):527-51.
9. Fransson Christer,2009 **Prevalence, extent and severity of peri-implantitis**, Department of Periodontology Institute of Odontology Sahlgrenska Academy University of Gothenburg Sweden
10. García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, Sánchez-Reyna PA, Mendieta-Zeron H. 2011; **Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice** International Dental Journal. 2011 (6):297-301. doi: 10.
11. Garza-Navarro, M. A., et al. 2013 **Totally Ecofriendly Synthesis of Silver Nanoparticles From Aqueous Dissolutions of Polysaccharides**. Hindawi Publishing Corporation.
12. H Jarvinen, J Tenovou, P Houvinen 1993 **In vitro susceptibility of Streptococcus mutans to chlorhexidine and six other antimicrobial agents**. Antimicrob Agents Chemother. May 1993; 37(5): 1158–1159.
13. Hyo Sang Park, Seong Hwa Jeong, Oh Won Kwon; 2006; **Factors affecting the clinical success of screw implants used as orthodontic anchorage** American Journal Dentofacial Orthopedics; 130;18-25
14. Jae Cho, DDS, MS,Phd (2006) **Clinical applications of Mini-implants as anchorage and peri-implant tissue Reaction Upon Loading**. CDA Journal. 34(10): 813-19
15. Jeffery J. Pucher and C. Daniel 1992 **The Effects of Chlorhexidine Digluconate on Human Fibroblasts In Vitro** Journal of Periodontology June , Vol. 63, No. 6, Pages 526-532

16. Karthikeyan Subramani, BDS, MSc Ronald E Jung DMD 2009 **Biofilm on Dental implants a review of the literature** Volume 24 Number 4
17. Katrin Loeschner, Niels Hadrup, Klaus Qvortrup, Agnete Larsen, Xueyun Gao, Ulla Vogel, Alicja Mortensen, Henrik Rye Lam, Erik H Larsen; 2011 June 1 **Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate** Part Fibre Toxicol; 8: 18.1743-8977-8-18
18. Khan Rahamathulla Antony V. (2010) **A Randomized Clinical Trial Evaluating the Efficacy of Chlorhexidine Varnish on Streptococcus mutans in Plaque and the Gingival Status in Patients Undergoing Orthodontic Treatment** The Orthodontic Cyber Journal, March 2010, 2-14
19. Ki-Young Nam; 2011; **In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles** J Adv Prosthodont. 3(1): 20–24.
20. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Oh KH, Kelman BJ, Hwang IK, Yu IJ. 2010; **Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles.** Part Fibre Toxicol.;7:20.
21. Kim JS, Kuk E, Yu KN, ;2007 ; **Antimicrobial effects of silver nanoparticles.** Nanomedicine.;3(1):95-101
22. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. 2010; **Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss.** J Periodontol. 81(2):231-8.
23. Liao J, Anchun M, Zhu Z, Quan Y. 2010; **Antibacterial titanium plate deposited by silver nanoparticles exhibits cell compatibility.** Int J Nanomedicine;5:337-42.

24. Liao Juan, Zhu Zhimin, Mo Anchun, Li Lei, Zhang Jingchao; 2010; **Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect** Int J Nanomedicine.; 5: 261–267.
25. Liu HL, Dai SA, Fu KY, Hsu SH 2010; **Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane.** Int J Nanomedicine;5:1017-28.
26. Madhumathi K. Sudheesh Kumar PT, Abhilash S, Sreeja V, Tamura H, Manzoor K, Nair SV, Jayakumar R. 2010; **Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications.** J Mater Sci Mater Med. 21(2):807-13.
27. Mc Bain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE 2003 **Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems.** Appl Environ Microbiol. 2003 Aug;69(8):4770-6.
28. Mombelli A., 1993; **Microbiology of the dental implant.** Adv Dental Res; 7(2); 202-206
29. Mombelli, A 2000; **Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis.** Journal of Periodontology; Vol. 28, 2002 177-189.
30. Morones, JR; Elichiguerra, JL; Camacho, A; Holt, K; Kouri, JB; Ramirez, JT; Yacaman, MJ; (2005) **The bactericidal effect of silver nanoparticles.** Nanotechnology , 16 (10) 2346 - 2353
31. Mritunjai Singh, Shinjini Singh, S, Prasad, I. S. Gambhir, 2008, **Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles;** Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures Vol. 3, No.3, p. 115 - 122 .

32. Nagarathna KN, Prashanth Kamath, Kumar Br, Mamatha Thomas 2012; **Factors affecting success of mini-implants a review**, The Orthodontic cyber journal .
33. Negroni M, Marcantoni Mabel; 2009; **Ecología de la cavidad Oral ;Microbiología Estomatológica fundamentos y guía practica**; Editorial panamericana; 2 edición; Cap 18; pag 242-245
34. Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC, Park K. 2010; **Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles.** Environ Toxicol Pharmacol.(2):162-8.
35. Pye AD, DE Lockhart, MP Dawson, CA Murray , AJ Smith. 2009; **A Review of dental implants and infection**; J Hospital Infect ; 72 (2) :104-10.
36. Quinteros B, Milva; Delgado Molina, E; Sánchez Garcés, Ángeles; Berini A, Leonardo; Gay Escoda, Cosme. 2000; **Estudio microbiológico de la periimplantitis; Presentación de 9 casos clínicos.** Av Periodon Implantol.; 12, 137-150
37. Rodríguez Esequiel, Casasa Rogelio 2004; **El uso de mini-implantes como anclaje absoluto** Revista latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatria
38. Rodríguez Hernández, A. G. 2009; **Estudio de la interacción de bacterias implicadas en la formación de placa dento-bacterina con superficies de titanio comercialmente puro invitro y su asociación con la peri-implantitis.** Tesis doctoral, Universidad Politècnica de Catalunya, Barcelona noooaun

39. Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Rouillet JB. 2008 **Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles.** J Antimicrob Chemother.;61(4):869-76.
40. Roncero Moure Alejandro 2009; **Causas de peri-implantitis** ESORIB http://www.esorib.com/trabajos_mes/Causa_peri.pdf
41. Rosetti Lessa¹; Andreza Maria Fabio Aranha¹; Indri Nogueira¹; Elisa Maria Aparecida Giro¹; Josimeri Hebling¹; Carlos Alberto de Souza Costa 2010 **Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells** Journal of Applied Oral Science vol.18 no.1 Bauru Jan./Feb. 2010
42. Samuel U, Guggenbichler JP; 2004; **Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter.** Int J Antimicrob Agents. Suppl 1:S75-8.
43. Schlagenhaut U, Ruppert M **La clorhexidina en odontología, aspectos generales Quintessence: Publicación internacional de odontología,** Vol. 18, Nº. 1, 2005 , págs. 12-23 2005;18(1):12-23
44. Schou S, Holmstrup P, Hjørting-Hansen E, Lang NP. 1992; **Plaque-induced marginal tissue reactions of osseointegrated oral implants: a review of the literature;** Clin Oral Implants Res.;3(4):149-61.
45. Shameli K, Bin Ahmad M, Zargar M, Yunus WM, Ibrahim NA, Shabanzadeh P, Moghaddam MG. 2011; **Synthesis and characterization of silver/montmorillonite/chitosan bionanocomposites by chemical reduction method and their antibacterial activity.** Int J Nanomedicine;6:271-84.
46. Sondi I, Salopek-Sondi B. 2004; **Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria.** J Colloid Interface Sci.;275(1):177-82.

47. Stoeken J.E. Versteeg P.A. Rosema Na 2007 **Inhibition of "de novo" plaque formation with 0.12% chlorhexidine spray compared to 0.2% spray and 0.2% chlorhexidine mouthwash.** J Periodontology 2007 May 78(5) 899-904.
48. Tat-Chi Leung M., BDS Morth , Cheuk- Kit Lee T., BDS, Morth , Rabie A. B. M., Phd, MSc, Wing-Kit Wong R., BDS, Morth, Phd , Morth PHD, Morth RCS(2008) **Use of miniscrews and miniplates in orthodontics.** J Oral Maxillofacial Surgery (66) 1461- 1466.
49. Ya Chen, Hee Moon Kyung, Wen Ting Zhao, Won Jae Yu 2009 **Critical factors for the success of orthodontic mini-implants; A systematic review;** Am J Orthodontics Dentofacial Orthopedics ; 135; 284-91.
50. Zitzmann NU, Berglundh T. Source 2008 Sep; **Definition and prevalence of peri-implant diseases.** J Clin Periodontol.;35(8 Suppl):286-91.

Anexos

Anexo 1

Figuras

11.1 ANEXO 1

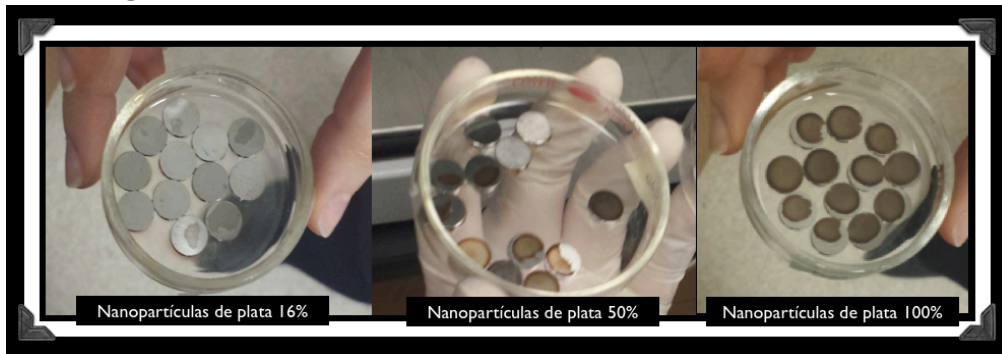


Figura 1. Deposición de nanopartículas de plata 24 horas después de su impregnación

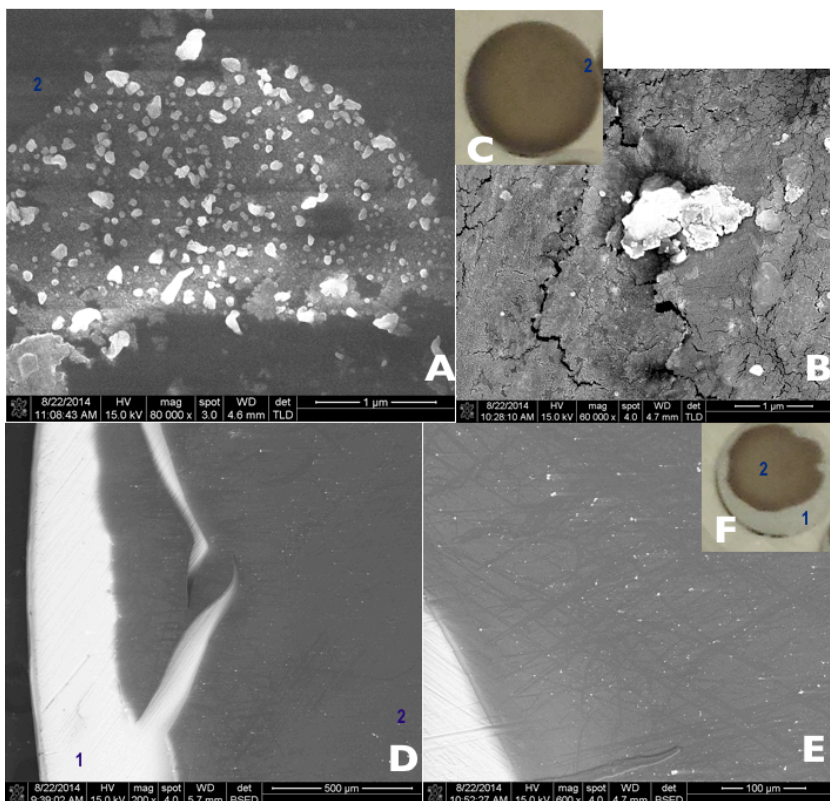


Figura 1.2 Micrografías tomadas por medio SEM Microscopia Electrónica de Barrido observando la caracterización morfológica de los discos de titanio con las NAg haciendo presencia de nanopartículas de plata distribuidas alrededor de la película de CMC a las 24 horas después de su impregnación **A)** Micrografía con una amplificación a una magnitud 80 000x, observando una distribución homogénea nanopartículas de plata **B)** Micrografía con una amplificación a una magnitud 60 000x **C)** Placa de titanio recubierta con la solución CMC de Nanopartículas de plata **D)** Micrografía con una amplificación a una magnitud 200x, muestra una parte recubierta por la película de NAg (2) y la otra parte de la placa de titanio sin nanopartículas de plata(1) **E)** Micrografía con una amplificación a una magnitud 200x, donde se observa la deposición de nanopartículas de plata **F)** Disco impregnado con la solución de NAg de la que se tomaron las micrografías D y E.

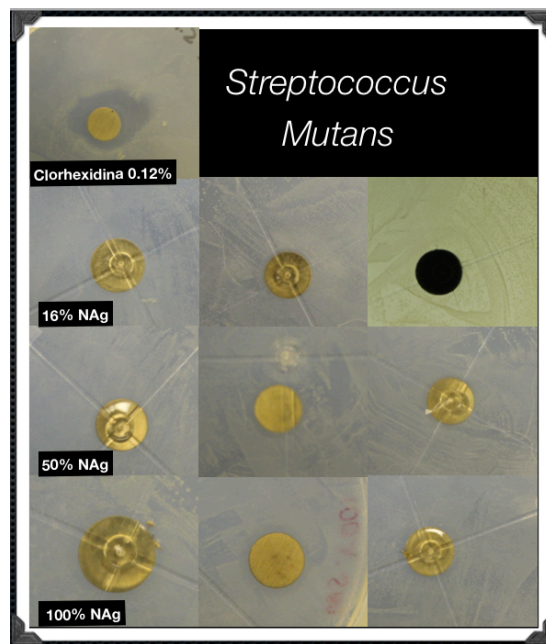


Figura 2. Prueba Antimicrobiana de *Streptococcus Mutans* con las 3 concentraciones distintas de N-Ag

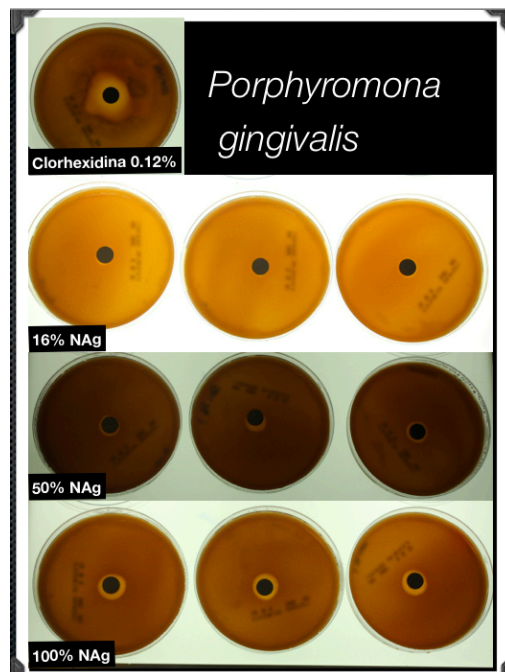
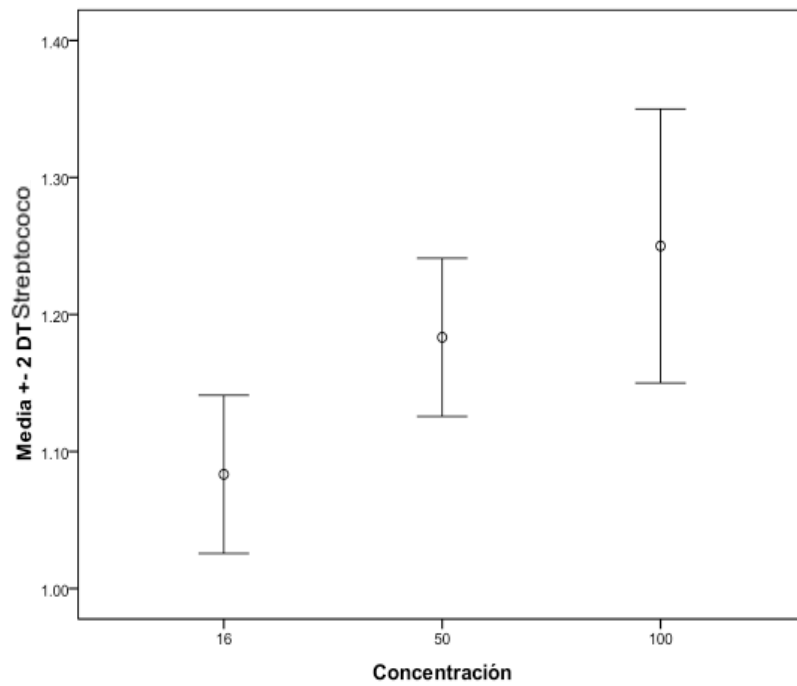
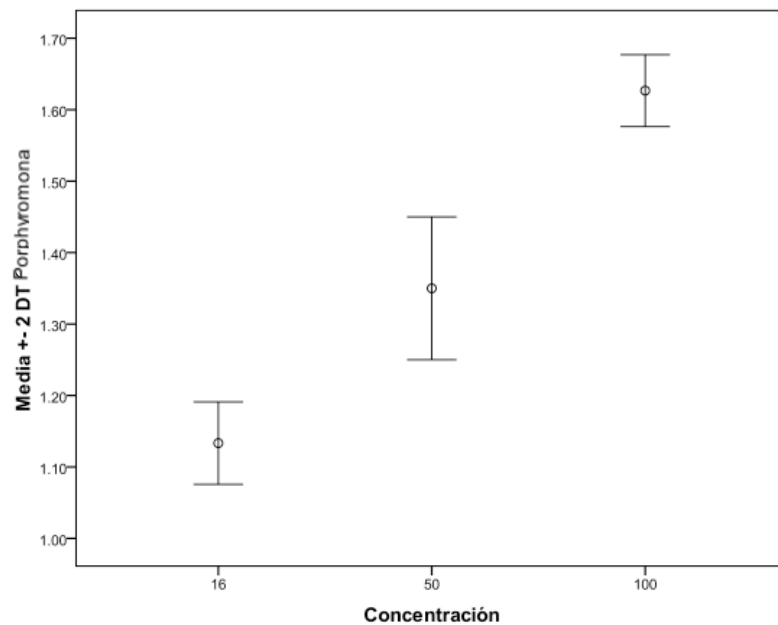


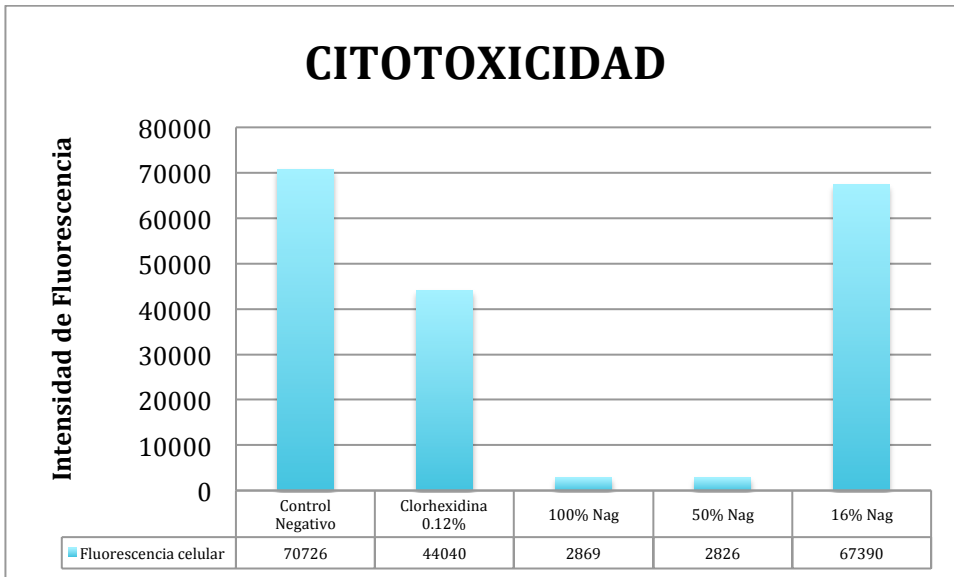
Figura 3. Prueba Antimicrobiana de *Porphyromona Gingivalis* con las 3 concentraciones distintas de N-Ag



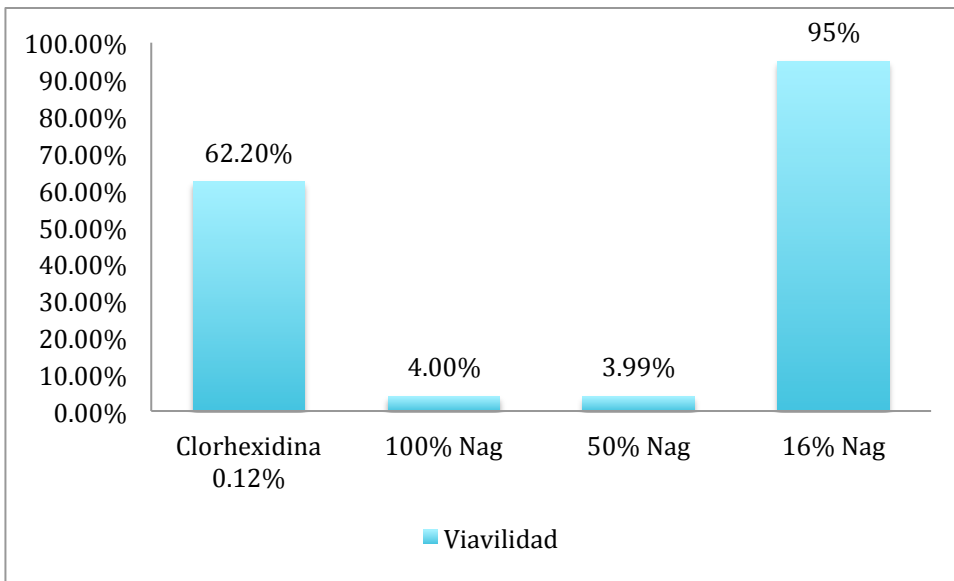
Grafica 1. Prueba de Tukey en la fase Antimicrobiana de *Streptococcus mutans* con las 3 concentraciones distintas de N-Ag, establece que el 50% y el 100% no arrojan resultados muy diferentes pero si difieren con el 16%.



Grafica 2. Prueba de Tukey en la fase Antimicrobiana de *Porphyromona Gingivalis* con las 3 concentraciones distintas de N-Ag, establece que las 3 concentraciones arrojan resultados muy diferentes



Grafica 3-A Prueba de Citotoxicidad para determinar Numero de intensidad de fluorescencia que representa la cantidad de células vivas con Nanopartículas de plata y de Clorhexidina en Celulas Madre Mesenquimales.



Grafica 3-B. Porcentajes de intensidad de fluorescencia que representa la viabilidad de las celulas madre mesenquimales de pulpa dental de dientes primarios tratadas con Nanopartículas de plata y Clorhexidina

Anexo 2

Tablas

11.2 ANEXO 2

<i>Streptococo Mutans</i>			
Concentración Nag	Halo de Inhibición		
16%	1.05	3	Numero de variables
16%	1.1	1.083333333	Promedio
16%	1.1	0.028867513	Desviación estandar
50%	1.2	3	Numero de variables
50%	1.15	1.183333333	Promedio
50%	1.2	0.028867513	Desviación estandar
100%	1.25	3	Numero de variables
100%	1.2	1.25	Promedio
100%	1.3	0.05	Desviación estandar
Control Positivo Clorhexidina 0.12%	1.7		
Control Negativo Sin NAg	1		

Tabla 1 Resultados Prueba Antimicrobiana *Streptococo Mutans*

<i>Porphyromona Gingivalis</i>			
Concentración NAg	Halo de Inhibición		
16%	1.15	3	Numero de variables
16%	1.15	1.133333333	Promedio
16%	1.1	0.028867513	Desviación estandar
50%	1.35	3	Numero de variables
50%	1.4	1.35	Promedio
50%	1.3	0.05	Desviación estandar
100%	1.6	3	Numero de variables
100%	1.63	1.626666667	Promedio
100%	1.65	0.025166115	Desviación estandar
Control Positivo Clorhexidina 0.12%	2.3		
Control Negativo Sin NAg	1		

Tabla 2 Resultados Prueba Antimicrobiana *Porphyromona Gingivalis*

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
<i>S mutans</i>	16%	50%
Media	1.083333333	1.183333333
Varianza	0.000833333	0.000833333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.000833333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
	-	
Estadístico t	4.242640687	
P(T<=t) una cola	0.0066178	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.0132356	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 3. Comparación *S mutans* entre el 16% y el 50% NAg

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
<i>s mutans</i>	16%	100%
Media	1.083333333	1.25
Varianza	0.000833333	0.0025
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.001666667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-5	
P(T<=t) una cola	0.003745217	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.007490434	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 4 Comparación *S mutans* entre el 16% y el 100% NAg

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
<i>s mutans</i>	50%	100%
Media	1.083333333	1.25
Varianza	0.000833333	0.0025
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.001666667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-5	
P(T<=t) una cola	0.003745217	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.007490434	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 5 Comparación *S mutans* entre el 50% y el 100% NA

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
<i>P gingivalis-2</i>	16%	50%
Media	1.133333333	1.35
Varianza	0.000833333	0.0025
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.001666667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-6.5	
P(T<=t) una cola	0.001445004	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.002890007	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 6. Comparación *P gingivalis* entre el 16% y el 50% NAg

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
<i>p gingivalis-2</i>	16%	100%
Media	1.133333333	1.626666667
Varianza	0.000833333	0.000633333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.000733333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-22.3118395	
P(T<=t) una cola	1.1945E-05	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	2.389E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 7 Comparación *P gingivalis* entre el 16% y el 100% NAg

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
<i>p gingivalis-2</i>	50%	100%
Media	1.466666667	1.550610927
Varianza	2.185833333	2.216747518
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	2.201290426	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0.069294372	
P(T<=t) una cola	0.474040572	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.948081145	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 8 Comparación *P gingivalis* entre el 50% y el 100% NAg

Descriptivos

Streptococo								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
16	3	1.0833	.02887	.01667	1.0116	1.1550	1.05	1.10
50	3	1.1833	.02887	.01667	1.1116	1.2550	1.15	1.20
100	3	1.2500	.05000	.02887	1.1258	1.3742	1.20	1.30
Total	9	1.1722	.07949	.02650	1.1111	1.2333	1.05	1.30

Tabla 9. *Streptococcus mutans*

ANOVA

Streptococo					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.042	2	.021	15.200	.004
Intra-grupos	.008	6	.001		
Total	.051	8			

Tabla 10 . ANOVA *Streptococcus mutans* El valor de la F = 15.200 tiene una significancia de 0.004 ($p < 0.01$), que indica que hay una alta diferencia significativa entre las medias del halo de inhibición debido a las concentraciones.

Descriptivos

Porphyromona								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
16	3	1.1333	.02887	.01667	1.0616	1.2050	1.10	1.15
50	3	1.3500	.05000	.02887	1.2258	1.4742	1.30	1.40
100	3	1.6267	.02517	.01453	1.5642	1.6892	1.60	1.65
Total	9	1.3700	.21645	.07215	1.2036	1.5364	1.10	1.65

Tabla 11. *Porphyromona gingivalis*

ANOVA

Porphyromona					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.367	2	.183	138.731	.000
Intra-grupos	.008	6	.001		
Total	.375	8			

Tabla 12 . ANOVA *Porphyromona gingivalis* El valor de la F = 138.731 tiene una significancia de 0.000 ($p < 0.01$), que indica que hay una alta diferencia significativa entre las medias del halo de inhibición debido a las concentraciones.

Streptococo

HSD de Tukey^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
16	3	1.0833	
50	3		1.1833
100	3		1.2500
Sig.		1.000	.151

Tabla 13. Prueba de Turkey para *S mutans*

Porphyromona

HSD de Tukey^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
16	3	1.1333		
50	3		1.3500	
100	3			1.6267
Sig.		1.000	1.000	1.000

Tabla 14 Prueba de Turkey para *P gingivalis*

Descriptivos

Citotoxicidad	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					Control Negativo	3		
Control Positivo	3	44040.00	528.488	305.123	42727.16	45352.84	43720	44650
100% NANOP	3	2869.00	98.321	56.766	2624.76	3113.24	2803	2982
50% NANOP	3	2826.00	199.872	115.396	2329.49	3322.51	2614	3011
16% NANOP	3	67390.00	900.167	519.711	65153.86	69626.14	66410	68180
Total	15	37570.33	30855.249	7966.791	20483.27	54657.40	2614	71510

ANOVA

Citotoxicidad	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1.333E10	4	3.331E9	9910.818	.000
Intra-grupos	3361298.667	10	336129.867		
Total	1.333E10	14			

Tabla 15 Prueba de citotoxicidad de Nanoparticulas de plata comparación de todos los tratamientos de las 3 concentraciones de Nanoparticulas de Plata y Controles.

ANOVA Prueba de citotoxicidad de Nanoparticulas de plata El valor de la F = 9910.818 tiene una significancia de 0.000 ($p < 0.01$), que indica que hay una alta diferencia significativa entre las medias de los diferentes tratamientos.

Citotoxicidad

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
50% NANOP	3	2826.00			
100% NANOP	3	2869.00			
Control Positivo	3		44040.00		
16% NANOP	3			67390.00	
Control Negativo	3				70726.67
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Tabla 16. Prueba de Turkey con las diferentes concentraciones de nanoparticulas y controles. Observando que entre el 50% y el 100% no existe una diferencia estadística.

Descriptivos

Citotoxicidad

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control Negativo	3	70726.67	735.822	424.827	68898.78	72554.55	70050	71510
100% NANOP	3	2869.00	98.321	56.766	2624.76	3113.24	2803	2982
50% NANOP	3	2826.00	199.872	115.396	2329.49	3322.51	2614	3011
16% NANOP	3	67390.00	900.167	519.711	65153.86	69626.14	66410	68180
Total	12	35952.92	34603.112	9989.058	13967.15	57938.69	2614	71510

ANOVA

Citotoxicidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1.317E10	3	4.389E9	12529.187	.000
Intra-grupos	2802698.667	8	350337.333		
Total	1.317E10	11			

Tabla 17 Prueba de citotoxicidad. Comparación de las 3 concentraciones de Nanoparticulas de Plata vs Control Positivo Clorhexidina .

ANOVA Prueba de citotoxicidad El valor de la F = 12529.187 tiene una significancia de 0.000 ($p < 0.01$), que indica que hay una alta diferencia significativa entre las medias de las 3 concentraciones de nanoparticulas de plata y el control positivo.

Comparaciones múltiples

Citotoxicidad
t de Dunnett (bilateral)^a

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
100% NANOP	Control Negativo	-67857.667 [*]	483.279	.000	-69249.35	-66465.99
50% NANOP	Control Negativo	-67900.667 [*]	483.279	.000	-69292.35	-66508.99
16% NANOP	Control Negativo	-3336.667 [*]	483.279	.000	-4728.35	-1944.99

Tabla 18. Prueba de T de Dunnett observando una significancia de 0.000 ($p < 0.01$), entre cada una de las comparaciones indicando que hay una alta diferencia significativa entre las medias de las 3 concentraciones de nano partículas de plata con el control negativo .

Descriptivos

Citotoxicidad	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					Control Positivo	3		
100% NANOP	3	2869.00	98.321	56.766	2624.76	3113.24	2803	2982
50% NANOP	3	2826.00	199.872	115.396	2329.49	3322.51	2614	3011
16% NANOP	3	67390.00	900.167	519.711	65153.86	69626.14	66410	68180
Total	12	29281.25	28927.861	8350.754	10901.36	47661.14	2614	68180

ANOVA

Citotoxicidad					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9.203E9	3	3.068E9	10770.863	.000
Intra-grupos	2278432.000	8	284804.000		
Total	9.205E9	11			

Tabla 19 Prueba de citotoxicidad. Comparación de las 3 concentraciones de Nanopartículas de Plata vs Control negativo. ANOVA El valor de la $F = 10770.863$ tiene una significancia de 0.000 ($p < 0.01$), que indica que hay una alta diferencia significativa entre las medias de las 3 concentraciones de nanopartículas de plata y el control negativo.

Comparaciones múltiples

Citotoxicidad t de Dunnett (bilateral) ^a						
(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
100% NANOP	Control Positivo	-41171.000*	435.740	.000	-42425.78	-39916.22
50% NANOP	Control Positivo	-41214.000*	435.740	.000	-42468.78	-39959.22
16% NANOP	Control Positivo	23350.000*	435.740	.000	22095.22	24604.78

Tabla 20 Prueba de T de Dunnett observando una significancia de 0.000 ($p < 0.01$), entre cada una de las comparaciones indicando que hay una alta diferencia significativa entre las medias de las 3 concentraciones de nano partículas de plata con el control positivo .

Descriptivos

Citotoxicidad	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					100% NANOP	3		
50% NANOP	3	2826.00	199.872	115.396	2329.49	3322.51	2614	3011
16% NANOP	3	67390.00	900.167	519.711	65153.86	69626.14	66410	68180
Total	9	24361.67	32274.586	10758.195	-446.78	49170.11	2614	68180

ANOVA

Citotoxicidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8.331E9	2	4.166E9	14533.056	.000
Intra-grupos	1719832.000	6	286638.667		
Total	8.333E9	8			

Tabla 21 Prueba de citotoxicidad. Comparación de las 3 concentraciones de Nanopartículas de Plata sin los Controles

ANOVA El valor de la F = 14533.056 tiene una significancia de 0.000 ($p < 0.01$), que indica que hay una alta diferencia significativa entre las medias de las 3 concentraciones de nanopartículas de plata.

Citotoxicidad

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
50% NANOP	3	2826.00	
100% NANOP	3	2869.00	
16% NANOP	3		67390.00
Sig.		.995	1.000

Tabla 22. Prueba de Turkey de citotoxicidad entre las tres concentraciones de nanopartículas de plata

