



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Especialidad en Endodoncia

**COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
SELLADORES ENDODÓNTICOS 'AH PLUS' Y 'MTA FILLAPEX'
ADICIONADOS CON QUITOSANO**

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de
Especialidad en Endodoncia

Presenta:
L.O. Javier Zavala Vargas

Dirigido por:
Dr. En C. Rubén Abraham Domínguez Pérez

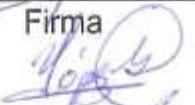
Dr. En C. Rubén Abraham Domínguez Pérez
Presidente


Firma

Dra. en C. Rosa Martha Pérez Serrano
Secretario


Firma

C.D.E.E. María Yolanda Elisa López Gómez
Vocal


Firma

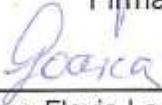
C.D.E.E. Irak Osiris Villareal Vera
Suplente


Firma

Dra. en C. María del Socorro Maribel Liñán Fernández
Suplente


Firma


Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Director de la Facultad de Medicina


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Abril, 2019



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

**COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
SELLADORES ENDODÓNTICOS 'AH PLUS' Y 'MTA FILLAPEX'
ADICIONADOS CON QUITOSANO**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Presenta:

L.O. JAVIER ZAVALA VARGAS

Expediente: 266848

Dirigido por:

D. EN C. RUBÉN ABRAHAM DOMÍNGUEZ PÉREZ

C.U. QUERÉTARO, QRO. ABRIL 2019.

RESUMEN

Se ha propuesto la incorporación de quitosano a los selladores endodónticos, ya que se ha establecido que aumenta su actividad antibacteriana. **Objetivo:** Determinar cuál sellador endodóntico, AH Plus® y MTA Fillapex®, posee una mayor actividad antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* adicionarle quitosano mediante 2 pruebas: Prueba de difusión en agar (ADT) y prueba de contacto directo (DCT). **Métodos:** Para la prueba de ADT, se utilizaron 7 cajas Petri con agar donde se inculó el *E. faecalis* y se colocaron los selladores endodónticos sin quitosano y adicionados con diversas concentraciones de quitosano. Los halos de inhibición obtenidos se midieron con ayuda del programa 'ImageJ'. Para la prueba de DCT, se utilizó 1 placa de cultivo celular de 24 pocillos donde se colocaron los selladores endodónticos sin quitosano y adicionados con varias concentraciones de quitosano y posteriormente se agregó medio de cultivo contaminado con *E. faecalis*. Se midió el crecimiento microbiano por densidad óptica utilizando un espectrofotómetro. **Resultados:** En ADT, la incorporación de quitosano redujo la capacidad antibacteriana de ambos selladores y esta disminuyó conforme se aumentaba la concentración de quitosano. En DCT, la adición de 1 µl quitosano en el MTA Fillapex® y de 1 µl y 10 µl de quitosano en el AH Plus® mejoró la capacidad antibacteriana de ambos selladores. **Conclusión:** El MTA Fillapex® con 1 µl de quitosano y el AH Plus® con 1 µl y 10 µl de quitosano fueron los grupos que mostraron un aumento en su capacidad antibacteriana al agregarle el biopolímero. El AH Plus con 10 µl de quitosano fue el grupo que presentó la mayor actividad antibacteriana contra *E. faecalis*.

(**Palabras clave:** endodoncia, quitosano, AH Plus®, MTA Fillapex®, actividad antibacteriana)

ABSTRACT

The incorporation of chitosan into endodontic sealants has been proposed, since it has been established that it increases its antibacterial activity. **Objective:** Determine which endodontic sealant, AH Plus® and MTA Fillapex®, has a greater antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* adding chitosan through 2 tests: agar diffusion test (ADT) and direct contact test (DCT). **Methods:** For the ADT test, 7 Petri dishes with agar were used where the *E. faecalis* was inoculated and the endodontic sealants were placed without chitosan and added with different concentrations of chitosan. The inhibition haloes obtained were measured with the help of the 'ImageJ' program. For the DCT test, a 24-well cell culture plate was used, where the endodontic sealants were placed without chitosan and added with various concentrations of chitosan, and subsequently culture medium contaminated with *E. faecalis* was added. Microbial growth was measured by optical density using a spectrophotometer. **Results:** In ADT, the incorporation of chitosan reduced the antibacterial capacity of both sealants and decreased as the concentration of chitosan increased. In DCT, the addition of 1 µl chitosan in the MTA Fillapex® and 1 µl and 10 µl of chitosan in the AH Plus® improved the antibacterial capacity of both sealants. **Conclusion:** The MTA Fillapex® with 1 µl of chitosan and the AH Plus® with 1 µl and 10 µl of chitosan were the groups that showed an increase in their antibacterial capacity when adding the biopolymer. The AH Plus with 10 µl of chitosan was the group that showed the highest antibacterial activity against *E. faecalis*.

(**Keywords:** endodontics, chitosan, AH Plus®, MTA Fillapex®, antibacterial activity)

DEDICATORIAS

A mis padres, Javier Zavala Alcaraz y María Eugenia Vargas Villagómez Q.E.P.D.

A mis hermanas, Perla Patricia y María Eugenia Zavala Vargas

A mi tía, Patricia Vargas Villagómez

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, a mis hermanas y a mi tía Patricia por el apoyo incondicional brindado a lo largo de estos 2 años.

A cada uno de los docentes y personal de la Especialidad en Endodoncia de la Universidad Autónoma de Querétaro, en especial al D. en C.E.E Rubén Abraham Domínguez Pérez por su paciencia, apoyo y asesoramiento en este trabajo y a lo largo de la carrera.

A mi novia, Jennifer Jara.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero brindado en el estudio y a lo largo de la carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	10
	1.1 Revisión de la literatura	10
	1.2 Planteamiento del problema	16
2.	OBJETIVOS	17
	2.1 Objetivo general	17
	2.2 Objetivos específicos	17
3.	METODOLOGÍA	18
	3.1 Sujeto experimental	18
	3.2 Métodos	18
	3.3 Análisis estadístico	29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
	4.1 Resultados	30
	4.2 Discusión	32
	4.3 Conclusiones	37
5.	REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Comparación de las zonas de inhibición en cm ² de los selladores AH Plus® y MTA Fillapex® en cajas Petri con <i>E. faecalis</i>	30
2. Comparación de la absorbancia de los selladores AH Plus® y MTA Fillapex®...	31

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Gráfica comparativa de las zonas de inhibición en cm ² de los selladores AH Plus® y MTA Fillapex® en cajas Petri con <i>E. faecalis</i>	31
2. Gráfica comparativa de la absorbancia de los selladores AH Plus® y MTA Fillapex®.....	32

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Revisión de la literatura

El principal objetivo del tratamiento endodóntico consiste en la eliminación de los microorganismos del espacio del conducto radicular y de los túbulos dentinarios adyacentes para prevenir el rebrote de microorganismos residuales (Takehashi et al., 1965; Sundqvist, 1976). La instrumentación biomecánica, la irrigación y la medicación intraconducto son los medios que nos pueden ayudar a lograr este objetivo (Weine, 1996).

Los cementos selladores del conducto radicular son necesarios para sellar el espacio entre la pared dentinaria y el material obturador. Estos selladores también llenan los huecos y las irregularidades del conducto radicular, los conductos laterales y accesorios, y los espacios que quedan entre las puntas de gutapercha usadas en la compactación lateral (Hargreaves et al., 2011). La obturación del conducto radicular intenta prevenir el rebrote de microorganismos residuales y la filtración bacteriana y de componentes tóxicos de la cavidad oral en los tejidos periapicales (Seltzer y Krasner, 1988). Esta obturación se consigue utilizando la combinación de un sellador endodóntico y gutapercha (Almeida et al., 2007).

Grossman et al. (1988) describieron las propiedades ideales del cemento sellador:

- Pegajoso durante la mezcla, para proporcionar buena adherencia con la pared del conducto una vez fraguado.
- Proporcionar un sellado hermético.
- Ser radiopaco, para poder verlo en las radiografías.
- Ser polvo muy fino, para poder mezclarlo fácilmente con el líquido.
- No contraerse al fraguar.
- No teñir la estructura dental.
- Ser bacteriostático, o por lo menos no favorecer la proliferación bacteriana.
- Fraguarse lentamente.
- Ser insoluble en los fluidos tisulares.

- Ser tolerado por los tejidos; es decir, no producir irritación del tejido perirradicular.
- Ser soluble en un solvente común, si se precisa eliminar el relleno del conducto radicular.

En la actualidad, ningún cemento sellador satisface todos los criterios (Hargreaves et al., 2011). Langeland (1974) concluyó que todos los cementos selladores presentan toxicidad cuando están recién mezclados; sin embargo, esta toxicidad disminuye considerablemente al fraguar. Los selladores endodónticos son reabsorbibles cuando entran en contacto con los tejidos y los fluidos tisulares (Barkhordar, 1989). Al parecer, la cicatrización y la reparación de los tejidos perirradiculares no se ven afectadas por la mayoría de los cementos selladores, siempre y cuando no se produzcan derivados catabólicos perjudiciales con el paso del tiempo (Boiesen y Brodin, 1991; Briseño y Willershausen, 1992).

Los productos de la descomposición de los cementos selladores pueden tener un efecto adverso sobre la capacidad de proliferación de las poblaciones celulares perirradiculares (Granchi et al., 1995). En consecuencia, Langeland (1974) mencionó que no deben colocarse habitualmente en los tejidos perirradiculares, como parte de la técnica de obturación. Los selladores endodónticos más populares son los hechos a base de óxido de zinc y eugenol, hidróxido de calcio, ionómero de vidrio y resina (Hargreaves et al., 2011). En la actualidad, además de los mencionados anteriormente, podemos encontrar los selladores endodónticos a base de siliconas y los biocerámicos (Zhou et al., 2013).

Los selladores endodónticos a base de resina se utilizan desde hace mucho tiempo, proporcionan adhesión y no contienen eugenol. El AH-26® es una resina epoxi de fraguado lento que libera formaldehído al fraguar (Spångberg et al., 1993; Koch, 1999). El AH Plus® es una fórmula modificada del AH-26® que no libera formaldehído (Leonardo et al., 1999) y que ha sido ampliamente evaluado por sus propiedades físico-químicas y su respuesta biológica (Duarte et al., 2010). El AH Plus® es una resina epoxi-bis-fenol en dos tubos. Tiene un tiempo de trabajo de aproximadamente 4 horas (Hargreaves et al., 2011).

Los selladores biocerámicos se introdujeron en endodoncia en la década de los 90's, primero como materiales de obturación retrógrada y después como cementos para reparación, selladores de conductos radiculares y como complemento para la obturación con conos de gutapercha. Las ventajas potenciales de los materiales biocerámicos en endodoncia están relacionadas con sus propiedades biológicas y físico-químicas (Ma et al., 2011).

El agregado de trióxido mineral (MTA®) es un biomaterial que ha sido investigado para aplicaciones endodónticas desde principios de los 90's (Roberts et al., 2008). Primero, se sugirió su uso para tratar las perforaciones radiculares y como material de obturación retrógrada (Lee et al., 1993; Torabinejad et al., 1993). Actualmente, el MTA® se usa también en tratamientos conservadores de la pulpa, reparación de reabsorciones radiculares y procedimientos de apexificación (Jacobovitz y De Lima 2008, 2009). El MTA® es ampliamente aceptado por su biocompatibilidad y su excelente capacidad de sellado (Scarparo et al., 2010).

A pesar de sus características favorables, Roberts et al. (2008) informó que el MTA® tiene propiedades físicas que dificultan su uso para la obturación del conducto radicular. La necesidad de un material biocompatible que induzca la formación de tejido mineralizado, y que también posea una fluidez y manipulación adecuadas, condujo al desarrollo de selladores endodónticos a base de MTA® como el Endo CPM Sealer® (EGEO, Buenos Aires, Argentina). El polvo consiste en partículas finas hidrofílicas que forman un gel coloidal en presencia de humedad, similar al MTA® (Gomes-Filho et al., 2009). Otro sellador endodóntico a base de MTA® pero con mayor consistencia, es el MTA Fillapex® (Angelus, Londrina, PR, Brasil), el cual tiene componentes resinosos y su fabricante afirma que tiene excelente radiopacidad, es fácil de manejar y posee un gran tiempo de trabajo (Morgental et al., 2011).

Sin embargo, a pesar de una meticulosa preparación biomecánica, irrigación profusa y una adecuada obturación, Waltimo et al. (2005) reportaron que los microorganismos pueden persistir en el 20-33% de los conductos radiculares, después del tratamiento de conductos e incluso cuando se ha usado hidróxido de calcio. Se ha

reportado que estos microorganismos persisten en los túbulos dentinarios, conductos laterales y ramificaciones apicales (Nair et al., 2005). Ricucci y Siqueira (2010), establecen que la persistencia bacteriana puede deberse a 3 factores:

- Una ineficaz irrigación intraconducto.
- Una pobre preparación mecánica que deja intactas gran parte de las superficies del conducto.
- Una ineficaz preparación químico-mecánica debido a limitaciones anatómicas.

El fracaso del tratamiento también puede ocurrir como resultado de la filtración coronal de saliva, nutrientes y la re-entrada de bacterias (Moradi et al., 2009). Estudios han demostrado que la microbiota del conducto radicular de los dientes con tratamiento endodóntico fallido difiere de la que normalmente se encuentra en los dientes no tratados (Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al. 2001).

El *E. faecalis* es la especie más comúnmente aislada en los dientes tratados endodónticamente asociados con lesiones periapicales persistentes (Sundqvist et al., 1998; Rôças et al., 2004). El *E. faecalis* posee varios factores de virulencia que contribuyen con su capacidad para sobrevivir a los efectos del tratamiento endodóntico (Kayaoglu y Ørstavik, 2004). Además, este anaerobio facultativo gram-positivo es capaz de invadir los túbulos dentinarios y unirse al colágeno (Love, 2001).

Por esta razón, particularmente cuando la necrosis pulpar y la periodontitis apical están presentes, la elección de un sellador endodóntico con una excelente capacidad de sellado y propiedades antibacterianas ayuda a disminuir o evitar el crecimiento de estos microorganismos persistentes (Sen et al., 1995; Shalhav et al., 1997). Los componentes antimicrobianos contenidos por la mayoría de los selladores deben ser liberados de la matriz selladora (Kishen et al., 2008) para poder difundirse dentro de los túbulos dentinarios (Kokkas et al., 2004). Una vez fijado, la liberación de estos componentes está asociada con la desintegración del sellador (Kayaoglu et al., 2005), lo que de acuerdo con DaSilva et al. (2013), puede comprometer las interfaces sellador-núcleo y sellador-dentina, haciéndolas vulnerables a la recolonización bacteriana.

La actividad antimicrobiana de los selladores endodónticos se ha investigado en varios estudios *in vitro* utilizando diversos métodos. Los métodos más utilizados incluyen la prueba de difusión en agar (ADT) y la prueba de contacto directo (DCT) (Orstavik, 1988). Aunque ADT y DCT miden la actividad antimicrobiana del sellador endodóntico probado, ADT ya no se recomienda para este propósito debido a que es una técnica relativamente insensible y los resultados dependen de la difusión y las propiedades físicas de los materiales probados (Tobias, 1988; Zhang et al., 2009). DCT fue diseñada para superar las limitaciones de ADT, ya que se ha demostrado que es una prueba cuantitativa más confiable y reproducible que muestra la actividad de los componentes antibacterianos insolubles y se puede utilizar en estudios estandarizados de envejecimiento (Nawal et al., 2011).

El quitosano es un biopolímero catiónico no tóxico que generalmente se obtiene por la desacetilación alcalina de la quitina, que es el componente principal del exoesqueleto de los crustáceos (Sinha et al., 2004). También es un bioadhesivo que se une fácilmente a las superficies con carga negativa y posee actividad antibacteriana contra una amplia variedad de hongos y bacterias (No et al., 2002; Calamari et al., 2011). La utilización de quitosano fosforilado en el colágeno dentinario induce la remineralización de la dentina debido a que sus grupos fosfato pueden unirse a los iones de calcio formando una superficie apta para la nucleación de cristales. Estos sitios de nucleación inducirían la formación de una capa de fosfato de calcio en la dentina (Xu et al., 2011) inhibiendo así la adherencia bacteriana (Sano et al., 2001). El quitosano también puede inducir la deposición de hidroxapatita después de su funcionalización específica (Budiraharjo et al., 2010).

Silva et al. (2013) realizaron un estudio en 25 conductos radiculares de caninos con el propósito de evaluar la eficacia del quitosano para la remoción del lodillo dentinario comparándolo con el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), el ácido cítrico y el ácido acético como irrigantes finales y encontraron que el ácido etilendiaminotetracético, el quitosano y el ácido cítrico son efectivos en la remoción del lodillo dentinario del tercio medio y apical del conducto radicular. Akincibay et al. (2007) demostraron que la aplicación tópica de quitosano en gel, ya sea solo o en combinación con metronidazol,

como coadyuvante a la terapia periodontal no quirúrgica en el tratamiento de la periodontitis crónica es efectiva, esto de acuerdo a un estudio que realizaron en 15 pacientes donde evaluaron parámetros como el índice de placa, profundidad de bolsa, pérdida de inserción clínica y recesión gingival. Más adelante, Uraz et al. (2012) realizaron un estudio donde utilizaron el quitosano como enjuague bucal, ya sea como enjuague único o en combinación con la clorhexidina, para evaluar y comparar los efectos antiplaca y el rango de los efectos inhibitorios sobre el test bacteriano y encontraron que el quitosano potencializó los efectos antiplaca de la clorhexidina, así como también la combinación de ambos obtuvo la menor cantidad de muestras con *S. mutans*.

Elsaka (2012) incorporó quitosano en diversas concentraciones (0.12%, 0.25%, 0.5% y 1%) a un agente adhesivo de grabado total con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana ante *S. mutans*, así como también evaluar las propiedades del adhesivo y encontró que el crecimiento bacteriano de los grupos experimentales con quitosano se redujo significativamente en comparación con el grupo control, conservando sus propiedades antibacterianas durante 7 días. Sin embargo, el adhesivo que incorporó 0.12% de quitosano, fue el único que no afectó negativamente sus propiedades adhesivas. Un año más tarde, Kim y Shin (2013) evaluaron el efecto antibacteriano contra *S. mutans* y las propiedades mecánicas de 3 resinas compuestas modificadas con quitosano en 3 pesos moleculares diferentes (bajo, medio y alto). Los resultados indicaron que todas las concentraciones de quitosano mostraron un efecto inhibitorio ante *S. mutans* pero la resina compuesta con un peso molecular medio de quitosano mostró valores significativamente más bajos en cuanto a la resistencia a la flexión y carga máxima cuando se comparó con el grupo control y las resinas compuestas que incorporaron quitosano con bajo y alto peso molecular.

1.2 Planteamiento del problema

En algunas ocasiones, después de haber concluido el tratamiento endodóntico, las bacterias pueden persistir dentro de los conductos radiculares (túbulos dentinarios, conductos laterales y ramificaciones apicales) llevando a un fracaso del tratamiento. Debido a esto, se ha intentado mejorar las propiedades de los cementos selladores mediante la adición de otros componentes, como el quitosano, el cual se ha reportado que potencializó la actividad antibacteriana de un cemento sellador a base de óxido de zinc y eugenol. Sin embargo, se desconoce si al agregar quitosano al AH Plus® y MTA Fillapex® también se puede mejorar su capacidad antibacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar cuál sellador endodóntico (AH Plus® o MTA Fillapex®) posee una mayor capacidad antibacteriana contra *E. faecalis* cuando se le adiciona quitosano.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar la capacidad antibacteriana contra *E. faecalis* del sellador endodóntico AH Plus® adicionado con quitosano.

Evaluar la capacidad antibacteriana contra *E. faecalis* del sellador endodóntico MTA Fillapex® adicionado con quitosano.

Comparar la capacidad antibacteriana contra *E. faecalis* de los selladores endodónticos AH Plus® y MTA Fillapex® adicionados con quitosano.

3. METODOLOGÍA

3.1 Sujeto experimental

Se realizó un estudio transversal, experimental y comparativo *in vitro* en el Laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinaria de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro donde todo el proceso se llevó a cabo dentro de una campana de bioseguridad para trabajar en las mejores condiciones.

Los selladores endodónticos utilizados MTA Fillapex® y AH Plus® se mezclaron acorde a las indicaciones del fabricante y la preparación de la solución de quitosano se realizó en el laboratorio.

3.2 Métodos

Preparación del quitosano

Se pesaron 30 mg de polvo de quitosano de bajo peso molecular de la marca Sigma-Aldrich en una báscula analítica (Figura 1) y se colocó en un tubo falcom con 30 ml de ácido acético glacial (Figura 2). Se mezcló y se dejó reposar por 24 hr. Se agregó una solución de NaOH para elevar el pH hasta que fuera mayor a 8 verificándolo en un potenciómetro (Figura 3).



Figura 1.



Figura 2.



Figura 3.

El tubo se colocó en un agitador vibratorio Vortex durante 5 min para su mezcla (Figura 4) y posteriormente se centrifugó a una velocidad de 5000 rpm durante 5 min, se tiró el sobrante y el pellet se lavó con alcohol étílico 70/30 hasta completar 10 ml para de nueva cuenta centrifugarlo a 5000 rpm durante 5 min. Se eliminó el exceso de líquido y se dejó secar durante 2 días. Se pesó el polvo liofilizado y se comenzó a agregar ácido acético gradualmente (Figura 5) hasta disolver el polvo de quitosano, con lo que se consiguió una solución de quitosano que sería utilizada en los experimentos. Se realizaron 2 tipos de pruebas para evaluar la capacidad antibacteriana de los selladores endodónticos, ADT y DCT.



Figura 4.



Figura 5.

ADT

Preparación de las placas de agar

Se utilizó el BD Difco™ Brain Heart Infusion Agar. Se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante, que consiste en pesar 52 gr de polvo agar por 1000 ml de tridestilada; para el estudio se preparó 500 ml, por lo que se pesaron 26 gr del medio de cultivo en la báscula analítica (Figura 6) y posteriormente se llevó a un matraz con ayuda de un embudo para comenzar su mezcla (Figura 7). Se mezcló homogéneamente mediante agitación constante sobre un agitador magnético con calentamiento hasta la disolución completa del polvo (Figura 8).

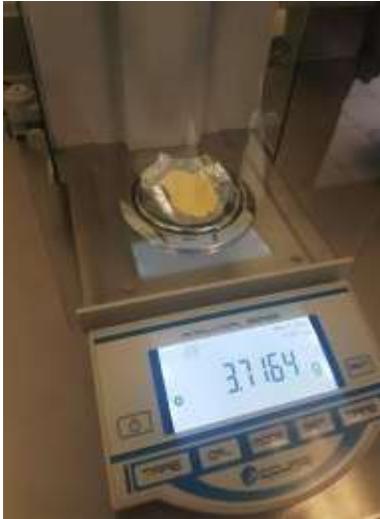


Figura 6.



Figura 7.



Figura 8.

Se selló el matraz con papel aluminio, papel de estraza y cinta testigo y se llevó al autoclave por 30 min a una temperatura de 125°C (Figura 9) y posteriormente se dejó enfriar. El preparado se vertió en 7 cajas Petri de plástico estériles desechables con fondo plano de manera horizontal colocando un aproximado de 20 ml en cada caja Petri (Figura 10). El medio de agar se dejó enfriar a temperatura ambiente para su gelificación colocando las cajas Petri entreabiertas cerca de 2 mecheros (Figura 11) hasta que el exceso de humedad se evaporó para cerrar las cajas Petri y almacenarlas en la incubadora por 24 h.



Figura 9.



Figura 10.



Figura 11.

Preparación del cultivo inicial estándar

Se tomó el tubo de cultivo PYREX® que contenía el *E. faecalis* (ATCC 51299) de la gradilla para tubos para realizar los pases (Figura 12). Para evitar la contaminación se colocó la micropipeta, las puntas de micropipeta y el tubo de cultivo con el *E. faecalis* cerca de los 2 mecheros. Se procedió a abrir la tapa del tubo de cultivo pasando la tapa y la boca del tubo cerca del mechero, se tomó 1 ml de *E. faecalis* y se llevó a un tubo de cultivo que contenía 9 ml de cultivo estéril (Figura 13). Las tapas y las bocas de los 2 tubos se pasaron sobre el mechero antes de cerrarlos, se colocaron en la gradilla (Figura 14) y se almacenaron en la incubadora durante 24 h para asegurar el crecimiento del *E. faecalis*.



Figura 12.



Figura 13.



Figura 14.

Inoculación de las placas de agar

Transcurridas las 24 hr, se retiraron las cajas Petri y la gradilla para tubos de la incubadora y se colocaron lo más cerca de los mecheros para evitar su contaminación. Se abrió la caja Petri procurando que la tapa no tocara ninguna superficie y se abrió el tubo de cultivo con *E. faecalis* pasando la tapa y la boca del tubo sobre el mechero. Se tomó una muestra del tubo de cultivo con ayuda de un hisopo estéril, el cual se sumergió en la suspensión y se presionó firmemente contra la superficie del tubo para eliminar el excedente. Antes de cerrar el tubo, se pasó la tapa y la boca del tubo sobre el mechero. Se inoculó sobre toda la superficie de las placas de agar por rayado de 2 a 3 veces girando al mismo tiempo la placa para asegurar una distribución uniforme (Figura 15).



Figura 15.

Preparación y colocación de los selladores endodónticos en las placas inoculadas

Se mezclaron los selladores endodónticos a estudiar, AH Plus® y MTA Fillapex® (Figura 16) siguiendo las indicaciones del fabricante para estandarizar las proporciones de cada uno.



Figura 16.

Para el AH Plus® se colocó:

1. .330 gr de pasta A y .330 gr de pasta B sin quitosano en una loseta estéril para el grupo control, se mezclaron con una espátula de cementos estéril (Figura 17) y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a una caja de agar ya inoculada (Figura 18) realizando un disco de aproximadamente 5 mm.



Figura 17.

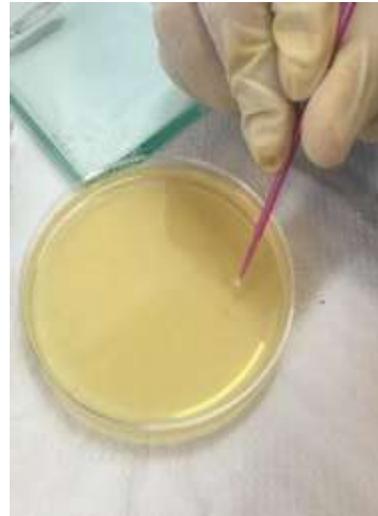


Figura 18.

2. .330 gr de pasta A y .330 de pasta B más 1 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a una caja de agar ya inoculada realizando un disco de aproximadamente 5 mm.
3. .330 gr de pasta A y .330 de pasta B más 5 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a una caja de agar ya inoculada realizando un disco de aproximadamente 5 mm.
4. .330 gr de pasta A y .330 de pasta B más 10 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a una caja de agar ya inoculada realizando un disco de aproximadamente 5 mm. Los 4 grupos se colocaron de tal manera que solo ocuparan la mitad de la caja Petri para utilizar la otra mitad con el sellador MTA Fillapex®.

Para el MTA Fillapex® se colocó:

1. .305 gr de base y .305 gr de catalizador sin quitosano en una loseta estéril para el grupo control, se mezclaron con una espátula de cementos y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a una caja de agar ya inoculada realizando un disco de aproximadamente 5 mm.
2. .305 gr de base y .305 gr de catalizador más 1 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a una caja de agar ya inoculada realizando un disco de aproximadamente 5 mm.
3. .305 gr de base y .305 gr de catalizador más 5 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a una caja de agar ya inoculada realizando un disco de aproximadamente 5 mm.
4. .305 gr de base y .305 gr de catalizador más 10 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a una caja de agar ya inoculada realizando un disco de aproximadamente 5 mm.

Una vez colocados todos los selladores endodónticos en las cajas Petri, se dejó que se fijaran cerca de los mecheros, se taparon y luego se colocaron boca abajo en una incubadora a una temperatura de 37°C (Figura 19) durante 24 hr.



Figura 19.

Medición del área de los halos de inhibición

Transcurridas las 24 hr, cada caja Petri se colocó junto a una regla milimetrada sobre un fondo negro (Figura 20) para poder realizar su calibración. Se tomaron fotografías de las cajas Petri y se examinaron en el programa 'ImageJ' (Figura 21) para determinar el halo de inhibición en cm^2 mediante una fórmula matemática: $\text{área total} - \text{área del sellador}$. Finalmente, las mediciones de los halos de inhibición se interpretaron por medio de tablas y gráficas en el programa Excel.



Figura 20.

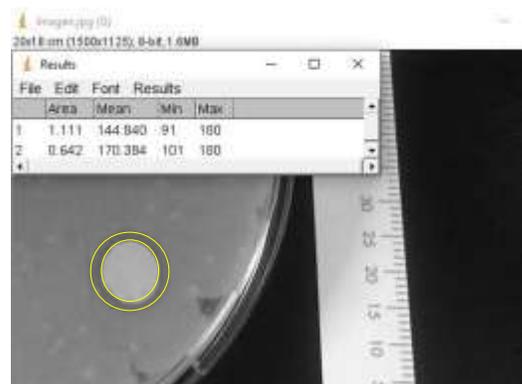


Figura 21.

DCT

Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el BD Difco™ Brain Heart Infusion. Se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante, que consiste en pesar 37 gr de polvo por 1000 ml de tridestilada; para el estudio se preparó 100 ml, por lo que se pesaron 3.7 gr del medio de cultivo en la báscula analítica y posteriormente se llevó a un matraz con ayuda de un embudo para comenzar su mezcla. Se mezcló homogéneamente mediante agitación constante sobre un agitador magnético con calentamiento hasta la disolución completa del polvo.

Se selló el matraz con papel aluminio, papel de estraza y cinta testigo y se llevó al autoclave por 30 min a una temperatura de 125°C y posteriormente se dejó enfriar.

Preparación y colocación de los selladores endodónticos en la placa de cultivo celular

Se mezclaron los selladores endodónticos a estudiar, AH Plus® y MTA Fillapex® siguiendo las indicaciones del fabricante para estandarizar las proporciones de cada uno colocando una mezcla en cada pozo de una placa de cultivo celular de fondo plano de 24 pocillos.

Para el AH Plus® se colocó:

1. .225 gr de pasta A y .225 gr de pasta B sin quitosano en una loseta estéril para el grupo control negativo, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a un pozo de la placa de cultivo cubriendo la superficie inferior en su totalidad.
2. .225 gr de pasta A y .225 gr de pasta B más 1 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a un pozo de la placa de cultivo cubriendo la superficie inferior en su totalidad.

3. 225 gr de pasta A y .225 gr de pasta B más 5 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a un pozo de la placa de cultivo cubriendo la superficie inferior en su totalidad.
4. 225 gr de pasta A y .225 gr de pasta B más 10 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a un pozo de la placa de cultivo cubriendo la superficie inferior en su totalidad.
5. Para el grupo control positivo, en uno de los pozos solo se dejó el cultivo contaminado con *E. faecalis* sin sellador.

Para el MTA Fillapex® se colocó:

1. .210 gr de base y .210 gr catalizador sin quitosano en una loseta estéril para el grupo control negativo, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a un pozo de la placa de cultivo cubriendo la superficie inferior en su totalidad.
2. .210 gr de base y .210 gr catalizador más 1 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a un pozo de la placa de cultivo cubriendo la superficie inferior en su totalidad.
3. .210 gr de base y .210 gr catalizador más 5 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a un pozo de la placa de cultivo cubriendo la superficie inferior en su totalidad.
4. .210 gr de base y .210 gr catalizador más 10 ul de quitosano en una loseta estéril, se mezclaron con una espátula de cementos estéril y con ayuda de un microbrush y la espátula se llevó la mezcla a un pozo de la placa de cultivo cubriendo la superficie inferior en su totalidad.
5. Para el grupo control positivo, en uno de los pozos solo se dejó el cultivo contaminado con *E. faecalis* sin sellador.

Esterilización de la placa de cultivo con los selladores

Una vez colocados los selladores endodónticos en la placa de cultivo celular (Figura 22), se selló la placa de cultivo con su respectiva tapa y se llevó al E3000 UV Transilluminator Accuris™ (Figura 23) para su esterilización donde se expuso a 2 ciclos de 5 min a luz ultravioleta (Figura 24). Después de terminar los ciclos, se agregó 3 ml de BHI estéril y 10 ul de cultivo contaminado con *E. faecalis* a cada pozo (Figura 25) y la placa se colocó en la incubadora durante 24 hr.



Figura 22.



Figura 23.

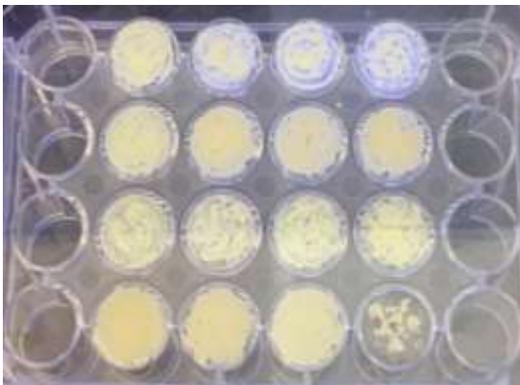


Figura 24.

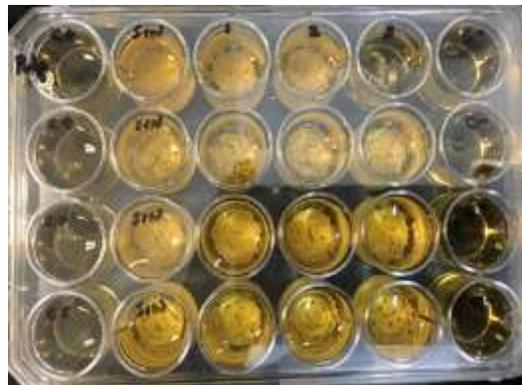


Figura 25.

Determinación del crecimiento microbiano por densidad óptica

Transcurridas las 24 hr, la placa de cultivo se retiró de la incubadora para observar el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica (prueba de absorbancia) con el NanoDrop Plus (Thermo Scientific) empleando una longitud de onda de λ 500nm con un factor de conversión de n° de células $1,00 \times 10^8$. Se tomó 1 ml de cultivo y se llevó a la celda de medición, siendo 2 celdas por cada grupo. Cada celda se midió 2 veces obteniendo 4 mediciones en total por cada pozo de las cuales se obtuvo la media. Como calibrador se usó el medio sin inoculación microbiana.

3.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron en media, desviación estándar y rango y se recopilaron en el programa Excel. Los análisis realizados para ADT y DCT fueron la prueba *t* de student para determinar si existieron diferencias entre 2 grupos y la prueba ANOVA para identificar posibles variaciones entre las medias de más de 2 grupos complementándolo con la prueba pos hoc de Tukey.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Se realizó la comparación de la capacidad antibacteriana de los 2 selladores endodónticos, AH Plus® y MTA Fillapex® adicionados con 1 µl, 5 µl y 10 µl de quitosano mediante las pruebas de ADT y DCT.

ADT

En la Tabla 1 se muestra la comparación de las áreas de inhibición en cm² de los selladores endodónticos AH Plus® y MTA Fillapex® incluidos en el estudio divididos en cuatro grupos (sin quitosano y adicionados con 1 µl, 5 µl y 10 µl de quitosano) realizados en cajas Petri donde previamente se inoculó *E. faecalis*.

Tabla 1. Comparación de las áreas de inhibición en cm² de los selladores AH Plus® y MTA Fillapex® en cajas Petri con *E. faecalis*.

	Grupo sin quitosano (n=7)	1 µl quitosano (n=7)	5 µl quitosano (n=7)	10 µl quitosano (n=7)	Valor de P*
		X±D.E (rango)			
AH Plus®	0.368±0.383 (.049-1.104)	0.348±0.364 (0-0.999)	0.293±0.250 (0.067-0.746)	0.242±0.308 (0.114-0.946)	0.9930
MTA Fillapex®	1.128±1.681 (0-4.491)	0.926±1.24 (0-3.304)	0.224±0.203 (0-0.499)	0.171±0.374 (0-0.985)	0.4907
Valor de P**	0.4570	0.4140	0.1338	0.6671	

X: Media; D.E: Desviación estándar. * ANOVA pos hoc de Tukey. ** t de student.

Se encontró que los 4 grupos experimentales de ambos selladores mostraron halos de inhibición, lo que sugiere que los 2 cementos son efectivos contra el *E. faecalis* aún en sus fórmulas originales. Sin embargo, las áreas de inhibición de los 2 selladores se vieron afectadas al incorporar quitosano y fueron disminuyendo cuando se aumentó la concentración de este biopolímero a cada una de las mezclas (Figura 1).

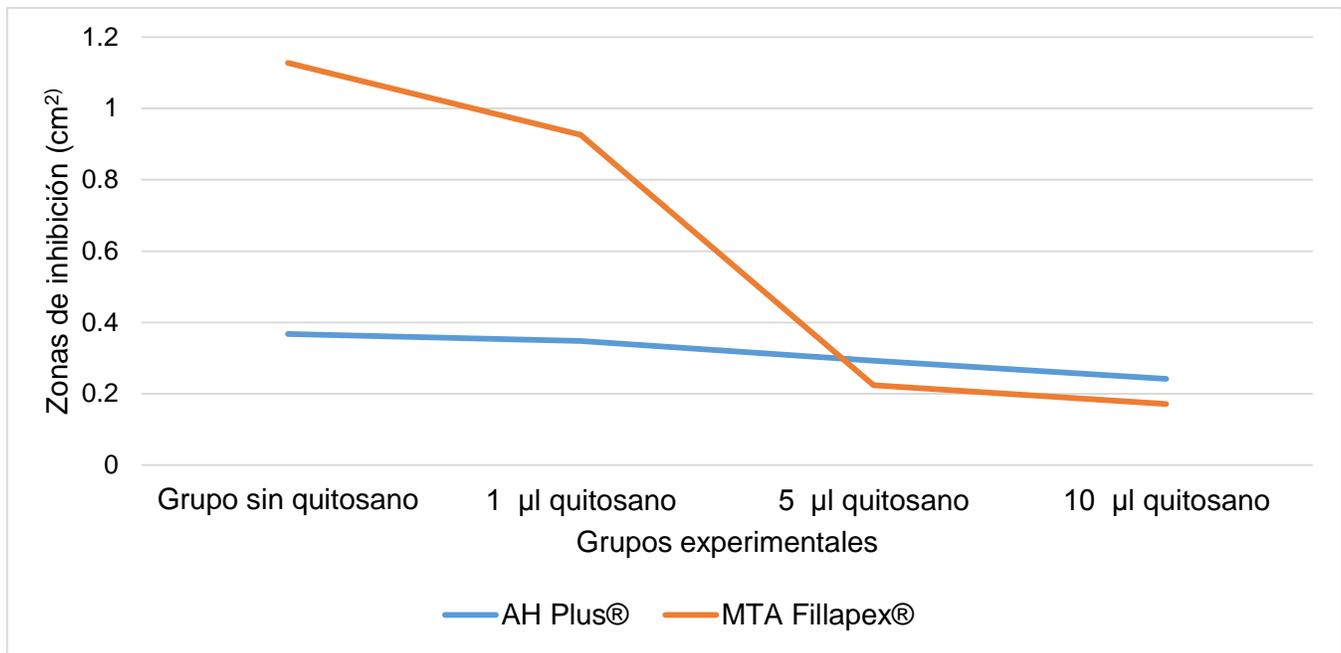


Figura 1. Gráfica comparativa de las áreas de inhibición en cm² de los selladores AH Plus® y MTA Fillapex® en cajas Petri con *E. faecalis*.

DCT

En la Tabla 2 se muestra la absorbancia de los selladores endodónticos AH Plus® y MTA Fillapex® incluidos en el estudio divididos en cinco grupos (sin cemento, sin quitosano y adicionados con 1 µl, 5 µl y 10 µl de quitosano) realizado en una placa de cultivo celular donde se colocó medio de cultivo contaminado con *E. faecalis*.

Tabla 2. Comparación de la absorbancia de los selladores AH Plus® y MTA Fillapex®.

	Grupo sin cemento (n=4)	Grupo sin quitosano (n=4)	1 µl quitosano (n=4)	5 µl quitosano (n=4)	10 µl quitosano (n=4)	Valor de P
	X±D.E. (rango)					
AH Plus®	1.942±0.015 (1.93-1.96)	0.14±0 (0.14-0.14)	0.067±0.015 (0.06-0.09)	0.205±0.005 (0.2-0.21)	0.045±0.005 (0.04-0.05)	<0.0001
MTA Fillapex®	2.096±0.014 (2.08-2.115)	0.417±0.041 (0.38-0.47)	0.412±0.009 (0.4-0.42)	1.045±0.012 (1.03-1.06)	1.255±0.012 (1.24-1.27)	<0.0001
Valor de P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

X: Media; D.E. Desviación estándar. Prueba ANOVA Y pos hoc de Tukey y Prueba t de student.

En DCT, se encontró que el quitosano si aumentó la capacidad antibacteriana de ambos selladores, sin embargo, no todas las concentraciones produjeron este efecto. En el MTA Fillapex® el grupo de 1 µl mostró el valor más bajo de absorbancia mientras que en el AH Plus®, los grupos de 1 µl y 10 µl mostraron los valores más bajos de absorbancia siendo el grupo de AH Plus con 10 µl el más efectivo contra el *E. faecalis* (Figura 2).

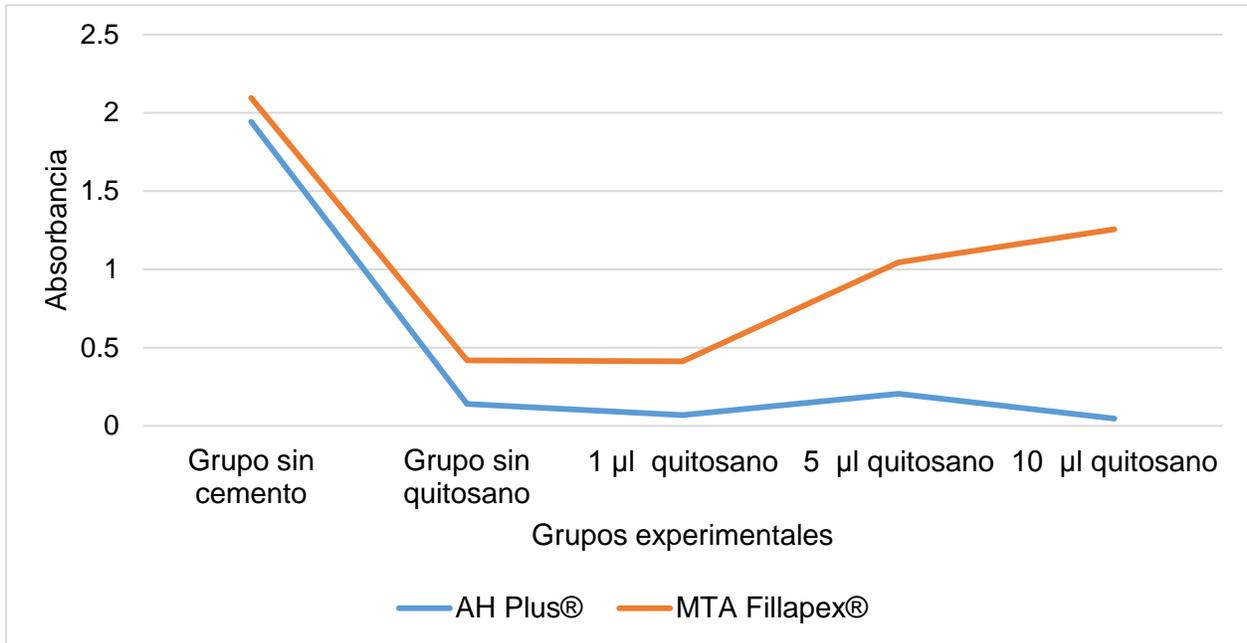


Figura 2. Gráfica comparativa de la absorbancia de los selladores AH Plus® y MTA Fillapex®.

Cabe resaltar que, en ambas pruebas, ADT y DCT, al agregar quitosano y aumentar la concentración en cada mezcla el MTA Fillapex® mostró una disminución en su capacidad antibacteriana en relación a su fórmula original excepto en el grupo de 1 µl de la prueba de contacto directo.

4.2 Discusión

En el presente estudio se escogió el *E. faecalis*, una bacteria anaerobia facultativa y gram positiva, ya que es la especie más comúnmente asociada con los tratamientos de conductos radiculares fallidos. El *E. faecalis* tiene la capacidad de sobrevivir por si solo en el conducto radicular (Stuart et al., 2006), además posee factores de virulencia que lo

hacen sobrevivir en el sistema de conductos incluso después de haber realizado el tratamiento endodóntico (Kayaoglu y Ørstavik, 2004). También tiene la capacidad de penetrar túbulos dentinarios y adherirse al colágeno en presencia de suero humano (Love, 2001). Por estas razones, se asocia con la periodontitis apical postratamiento, ya que es un microorganismo muy difícil de erradicar del conducto radicular. Evans et al. (2002) mencionaron que esto podría deberse a la capacidad que tiene el *E. faecalis* de regular el pH interno y la bomba de protones, así como de soportar la inanición prolongada (Figdor et al., 2003).

La finalidad del material de obturación del conducto radicular es que ocupe y selle el espacio del conducto preparado evitando así la filtración bacteriana. Una de las propiedades ideales del sellador endodóntico es la capacidad antibacteriana, que puede eliminar las bacterias que permanecen en los conductos radiculares previniendo la periodontitis apical. Es bien sabido que los selladores endodónticos poseen esta propiedad antibacteriana durante un tiempo máximo de 1 semana, y la mayoría de estos, muestran una disminución significativa en este efecto antimicrobiano una vez fijados (Siqueira Jr et al., 2000; Kayaoglu et al., 2005).

El AH Plus® fue uno de los selladores utilizados en esta investigación, el cual es un sellador a base de resina epóxica y a diferencia de su antecesor, el AH26®, no libera formaldehído o libera muy poco al fraguar (Cohen et al., 1998). El efecto antimicrobiano del AH Plus® se puede atribuir a la presencia de componentes antibacterianos en la resina epoxi y las aminas y a la fácil difusión de estos componentes en el ambiente circundante antes de que el material se fije (Fuss et al., 2000).

El otro sellador empleado fue el MTA Fillapex®, introducido al mercado en el 2010, que es un sellador a base de silicato de calcio compuesto básicamente por MTA®, resina de salicilato, resina natural, óxido de bismuto y sílice, el cual tiene propiedades fisicoquímicas adecuadas, como una buena radiopacidad y fluidez, además de un pH alcalino de 12.5 al fijarse, comparable con el del hidróxido de calcio (Silva et al., 2013). La gran capacidad antibacteriana del MTA Fillapex® se debe a su alto pH provocado por la presencia de óxido de calcio en el MTA®, que al entrar en contacto con el agua forma

hidróxido de calcio (Torabinejad et al., 1995; Yasuda et al, 2008), y de silicato de calcio, propiamente en el MTA Fillapex®, el cual se hidrata y se vuelve un hidrogel al interactuar con la humedad de la dentina (Zhang et al., 2009).

El objetivo de esta investigación fue comparar la capacidad antibacteriana de 2 selladores endodónticos adicionados con diferentes concentraciones de quitosano contra el *E. faecalis*, mediante las pruebas de ADT y DCT.

ADT se ha utilizado ampliamente para investigar la actividad antibacteriana de los selladores y es uno de los métodos más comunes y simples, sin embargo, tiene algunas limitaciones como la falta de estandarización de la densidad del inóculo, un medio de cultivo adecuado, la viscosidad del agar, las condiciones de almacenamiento y la dependencia de la solubilidad y las características de difusión del material probado y del medio (Çobankara et al., 2004). Por lo tanto, esta prueba es más adecuada con los materiales solubles en agua (Mickel et al., 2003). Debido a esto, ADT ya no es la única prueba recomendada para evaluar la actividad antimicrobiana de los cementos utilizados en endodoncia.

En los resultados de la prueba de ADT del presente estudio se encontró que los 4 grupos experimentales de ambos selladores mostraron halos de inhibición. Sin embargo, las áreas de inhibición de los 2 selladores se redujeron al agregar el quitosano y fueron disminuyendo cuando se aumentó la concentración de este biopolímero a cada una de las mezclas.

En cambio, en DCT, la actividad antibacteriana no depende de la solubilidad y la difusibilidad de los materiales probados (Slutzky-Goldberg et al., 2008). Esta prueba imita el contacto directo entre los microorganismos y los selladores endodónticos dentro de un conducto radicular y tiene varias ventajas, como la reproducibilidad y el ensayo cuantitativo (Heyder et al., 2013).

Los resultados de DCT difieren de los encontrados en la prueba de ADT donde se observó que el quitosano si aumentó la capacidad antibacteriana de ambos

selladores, sin embargo, no todas las concentraciones lograron este efecto. En el MTA Fillapex®, el grupo de 1 µl mostró el valor más bajo de absorbancia mientras que en el AH Plus® los grupos de 1 µl y 10 µl tuvieron los valores más bajos de absorbancia siendo el grupo de AH Plus con 10 µl de quitosano el más efectivo contra el *E. faecalis*.

Kishen et al. (2008) fueron los primeros en utilizar el quitosano en el área de endodoncia y lo utilizaron para mejorar la desinfección del conducto radicular. Sus resultados concluyeron que la dentina tratada con esta microestructura mostró una adhesión significativamente reducida de *E. faecalis*. Estos mismos autores incorporaron nanopartículas de quitosano a un sellador endodóntico a base de óxido de zinc y eugenol y encontraron que hubo una disminución en el número de *E. faecalis* en comparación con el sellador en su fórmula original, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas.

DaSilva et al. (2013) y del Carpio-Perochena et al. (2015) también evaluaron los efectos del quitosano sobre la propiedad antibacteriana de varios selladores endodónticos. En el primer estudio evaluaron la formación de biopelículas de *E. faecalis* dentro de las interfaces sellador-dentina de segmentos de raíces obturados con gutapercha y un sellador a base de óxido de zinc y eugenol (Pulp Canal Sealer®) adicionado con nanopartículas de quitosano observando que las áreas de biopelículas fueron significativamente más pequeñas en el grupo tratado con quitosano que en el control. En el segundo estudio, muy similar al descrito por DaSilva, agregaron nanopartículas de quitosano a dos selladores endodónticos: uno a base de resina epóxica (ThermaSeal Plus®) y otro de silicato de calcio (MTA Fillapex®) encontrando una mejoría en la propiedad antibacteriana de ambos selladores e incluso incrementándola aún después de 4 semanas. Estos hallazgos encontrados en la literatura son comparables con algunos de los obtenidos en DCT de nuestra investigación demostrando que la incorporación de quitosano a un sellador endodóntico aumentará su capacidad antibacteriana, sin embargo, en el presente estudio esto dependió de la concentración de quitosano y de la composición química de cada cemento. Es importante mencionar que en los otros estudios se utilizaron nanopartículas de quitosano, las cuales presentan una estructura diferente al quitosano utilizado en este trabajo.

El quitosano ha recibido un gran interés en la biomedicina debido a su versatilidad para emplearse en diversas formas como polvos (micro y nanopartículas), cápsulas, películas, andamios e hidrogeles. Se ha utilizado principalmente para aplicaciones antibacterianas y en la administración de fármacos/genes. Además, posee excelentes propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas (Rabea et al., 2003). Shrestha et al. (2009) demostraron en su estudio que las nanopartículas de quitosano tienen la capacidad de alcanzar las complejidades anatómicas y los túbulos dentinarios de un conducto radicular infectado para mejorar su desinfección.

No se conoce con exactitud el mecanismo de acción del quitosano pero se atribuye a su naturaleza policatiónica e implica la interacción del quitosano cargado positivamente con membranas celulares bacterianas cargadas negativamente. Esto podría conducir a una alteración de la permeabilidad de la pared celular, provocando la ruptura de las células y la filtración de los componentes proteicos y otros componentes celulares (Rabea et al., 2003; Qi et al., 2004). Bajo microscopía electrónica de transmisión, se observó que las bacterias estaban completamente envueltas en el quitosano, formando una barrera impermeable (Muzzarelli et al., 1990). Esto podría evitar el transporte de solutos esenciales provocando la muerte celular.

Ambos selladores tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. faecalis* al incorporarles quitosano, sin embargo, no todas las concentraciones tuvieron el mismo efecto ya que en el MTA Fillapex® el grupo de 1 µl mostró la mayor actividad antibacteriana mientras que en el AH Plus® los grupos de 1 µl y 10 µl mostraron la mayor actividad siendo el grupo de AH Plus® con 10 µl de quitosano el más efectivo contra *E. faecalis*.

Al incorporar otros elementos a los selladores endodónticos es importante conocer los efectos que podrían ocurrir sobre el comportamiento de los cementos. En este estudio se pudo comprobar que al agregar quitosano ambos selladores presentaron una disminución en el tiempo de trabajo y empeoraba cuando se aumentaba la concentración de quitosano. El cambio en esta propiedad podría explicar porque al

agregar quitosano al MTA Fillapex®, tanto en la prueba de ADT y DCT, mostró una disminución significativa en su capacidad antibacteriana en relación a su fórmula original excepto en el grupo de 1 µl de la prueba de contacto directo.

4.3 Conclusión

En ADT, la incorporación de quitosano redujo la capacidad antibacteriana de ambos selladores ya que influyó en las áreas de inhibición, las cuales disminuían conforme se aumentaba la concentración del biopolímero a cada una de las mezclas. Por otro lado, en DCT, la adición de quitosano si mejoró la capacidad antibacteriana de ambos selladores, pero esto solo se logró con determinadas concentraciones. En el caso del MTA Fillapex® solo ocurrió al agregar 1 µl de quitosano mientras en el AH Plus® se logró al agregar 1 µl y 10 µl de quitosano siendo el grupo de AH Plus® con 10 µl de quitosano el que presentó la mayor actividad antibacteriana contra *E. faecalis*. Finalmente podemos concluir en el presente estudio que la incorporación de quitosano a un sellador endodóntico aumentará su capacidad antibacteriana pero esto dependerá de la concentración de quitosano y de la composición química de cada cemento, por lo que es necesario realizar más estudios sobre la capacidad antimicrobiana de los selladores endodónticos adicionados con quitosano.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akincibay H, Şenel S, Yetkin Ay Z. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2007;80(2):290–6.
- Almeida JFA, Gomes B, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ, Zaia AA. Filling of artificial lateral canals and microleakage and flow of five endodontic sealers. *Int Endod J*. 2007;40(9):692–9.
- Barkhordar RA. Evaluation of antimicrobial activity in vitro of ten root canal sealers on *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1989;68(6):770–2.
- Boiesen J, Brodin P. Neurotoxic effect of two root canal sealers with calcium hydroxide on rat phrenic nerve in vitro. *Dent Traumatol*. 1991;7(6):242–5.
- Briseño BM, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity with human gingival fibroblasts: III. Calcium hydroxide-based sealers. *J Endod*. 1992;18(3):110–3.
- Budiraharjo R, Neoh KG, Kang ET. Bioactivity of novel carboxymethyl chitosan scaffold incorporating MTA in a tooth model. *Int Endod J*. 2010;43(10):930–9.
- Calamari S-E, Bojanich M-A, Barembaum S-R, Berdicevski N, Azcurra A-I. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(1):E23–8.
- Çobankara FK, Altinöz HC, Erganiş O, Kav K, Belli S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *J Endod*. 2004;30(1):57–60.
- Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. Formaldehyde evaluation from endodontic materials. *Oral Health*. 1998;88(12):37–9.
- DaSilva L, Finer Y, Friedman S, Basrani B, Kishen A. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *J Endod*. 2013;39(2):249–53.
- del Carpio-Perochena A, Kishen A, Shrestha A, Bramante CM. Antibacterial properties associated with chitosan nanoparticle treatment on root dentin and 2 types of endodontic sealers. *J Endod*. 2015;41(8):1353–8.
- Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Bernardes RA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, et al. Influence of calcium hydroxide association on the physical properties of AH Plus. *J Endod*. 2010;36(6):1048–51.
- Elsaka SE. Antibacterial activity and adhesive properties of a chitosan-containing dental adhesive. *Quintessence Int (Berl)*. 2012;43(7).
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002;35(3):221–8.

- Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(4):234–9.
- Fuss Z, Charniaque O, Pilo R, Weiss E. Effect of various mixing ratios on antibacterial properties and hardness of endodontic sealers. *J Endod*. 2000;26(9):519–22.
- Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PFE, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod*. 2009;35(2):256–60.
- Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Cavedagna D, Stea S, Pizzoferrato A. Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of in vitro cultured osteoblasts. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 1995;79(3):359–66.
- Grossman LLI, Oliet S, Del Rio CE. *Endodontic practice*. Lea & Febiger; 1988.
- Hargreaves KM. *Vías de la pulpa*. Elsevier España; 2011.
- Heyder M, Kranz S, Völpel A, Pfister W, Watts DC, Jandt KD, et al. Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. *Dent Mater*. 2013;29(5):542–9.
- Jacobovitz M, De Lima RKP. Treatment of inflammatory internal root resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. *Int Endod J*. 2008;41(10):905–12.
- Jacobovitz M, De Pontes Lima RK. The use of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on apexification of a replanted tooth: a case report. *Dent Traumatol*. 2009;25(3):e32–6.
- Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1965;20(3):340–9.
- Kayaoglu G, Erten H, Alacam T, Ørstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2005;38(7):483–8.
- Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(5):308–20.
- Kim J-S, Shin D-H. Inhibitory effect on *Streptococcus mutans* and mechanical properties of the chitosan containing composite resin. *Restor Dent Endod*. 2013;38(1):36–42.
- Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod*. 2008;34(12):1515–20.
- Koch MJ. Formaldehyde release from root-canal sealers: influence of method. *Int Endod J*. 1999;32(1):10–6.
- Kokkas AB, Boutsoukis AC, Vassiliadis LP, Stavrianos CK. The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an

- in vitro study. *J Endod.* 2004;30(2):100–2.
- Langeland K. Root canal sealants and pastes. *Dent Clin North Am.* 1974;18(2):309–27.
- Lee S-J, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod.* 1993;19(11):541–4.
- Leonardo MR, da Silva LAB, Tanomaru Filho M, da Silva RS. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 1999;88(2):221–5.
- Love RM. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34(5):399–405.
- Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod.* 2011;37(6):793–8.
- Mickel AK, Nguyen TH, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2003;29(4):257–8.
- Moradi S, Naghavi N, Rohani E, Javidi M. Evaluation of microleakage following application of a dentin bonding agent as root canal sealer in the presence or absence of smear layer. *J Oral Sci.* 2009;51(2):207–13.
- Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD de, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PMP. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011;44(12):1128–33.
- Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(10):2019–23
- Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2005;99(2):231–52.
- Nawal RR, Parande M, Sehgal R. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. *Int Endod J.* 2011;44(4):307–13.
- No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol.* 2002;74(1):65–72.
- Orstavik D. Antibacterial properties of endodontic materials. *Int Endod J.* 1988;21(2):161–9.
- Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001;34(6):429–34.
- Qi L, Xu Z, Jiang X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles.

- Carbohydr Res. 2004;339(16):2693–700.
- Rabea EI, Badawy ME-T, Stevens C V, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1457–65.
- Ricucci D, Siqueira JF. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod*. 2010;36(1):1–15.
- Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater*. 2008;24(2):149–64.
- Rôças IN, Jung I-Y, Lee C-Y, Siqueira JF. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod*. 2004;30(7):504–8.
- Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T. Comparison of the activity of four chitosan derivatives in reducing initial adherence of oral bacteria onto tooth surfaces. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2001;42(4):243–9.
- Scarpato RK, Haddad D, Acasigua GAX, Fossati ACM, Fachin EVF, Grecca FS. Mineral trioxide aggregate–based sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. *J Endod*. 2010;36(7):1174–8.
- Seltzer S, Krasner P. *Endodontology 2 Ed: Biologic considerations in endodontic procedures*. Lea & Febiger; 1988.
- Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Dent Traumatol*. 1995;11(1):6–9.
- Shalhav M, Fuss Z, Weiss EI. In vitro antibacterial activity of a glass ionomer endodontic sealer. *J Endod*. 1997;23(10):616–9.
- Shrestha A, Fong S-W, Khoo B-C, Kishen A. Delivery of antibacterial nanoparticles into dentinal tubules using high-intensity focused ultrasound. *J Endod*. 2009;35(7):1028–33.
- Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod*. 2013;39(2):274–7.
- Silva P V, Guedes DFC, Nakadi F V, Pécora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. *Int Endod J*. 2013;46(4):332–8.
- Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm*. 2004;274(1):1–33.
- Siqueira Jr JF, Favieri A, Gahyva SMM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod*.

2000;26(5):274–7.

Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, Matalon S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. *J Endod.* 2008;34(6):735–8.

Spångberg LSW, Barbosa S V, Lavigne GD. AH26 releases formaldehyde. *J Endod.* 1993;19(12):596–8.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93–8.

Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Univ.; 1976.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 1998;85(1):86–93.

Tobias RS. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int J Endod* 1988; 21(2):155– 60.

Torabinejad M, Hong CU, Ford TRP, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod.* 1995;21(8):403–6.

Torabinejad M, Watson TF, Ford TRP. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993;19(12):591–5.

Uraz A, Boynueğri D, Özcan G, Karaduman B, Uç D, Şenel S, et al. Two percent chitosan mouthwash: A microbiological and clinical comparative study. *J Dent Sci.* 2012;7(4):342–9.

Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod.* 2005;31(12):863–6.

Weine FS. *Endodontic therapy*, 5th edn. St. Louis, MO: Mosby-Year Book. Inc; 1996.

Xu Z, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2011;98(1):150–9.

Yasuda Y, Kamaguchi A, Saito T. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a new resin-based endodontic sealer against endodontic pathogens. *J Oral Sci.* 2008;50(3):309–13.

Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009;35(7):1051–5.

Zhou H, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng Y, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod.* 2013;39(10):1281–6.