



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Análisis de la biocompatibilidad/citotoxicidad de
nanopartículas de plata en pulpa dental.*

AUTOR/A Ángeles Manzanera Mondéjar

DIRECTOR/ES Julia Guerrero Gironés
 Sergio López García
 Berta Rivas Mundiña

2025



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Análisis de la biocompatibilidad/citotoxicidad de nanopartículas de plata en pulpa dental.

AUTOR/A Ángeles Manzanera Mondéjar

DIRECTOR/ES Julia Guerrero Gironés
 Sergio López García
 Berta Rivas Mundiña

2025



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR/A

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D. Ángeles Manzanera Mondéjar, habiendo cursado el Programa de Doctorado Integración y Modulación de Señales en Biomedicina de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Análisis de la biocompatibilidad/citotoxicidad de las nanopartículas de plata en pulpa dental.

y dirigida por:

D.: Julia Guerrero Gironés
D.: Sergio López García
D.: Berta Rivas Mundiña

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a 1 Septiembre 2025

(firma)

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la quinta hoja, después de la portada de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.

AGRADECIMIENTOS

“Es de bien nacido ser agradecido”, decía Miguel de Cervantes. Es por ello que debo darles las gracias a mis principales guías en este proyecto tan importante a nivel académico, pero sobre todo personal: a mis directores.

Gracias Julia Guerrero Gironés por confiar en mi desde el grado. Por ser ejemplo de constancia y superación, pero también fuente de apoyo y fuerza cuando lo he necesitado. Aún guardo las palabras que me escribiste en 2019 y es por ello que dejo aquí plasmado mi agradecimiento como respuesta y símbolo de admiración por lo que haces.

Gracias Sergio López García por tu generosidad, tus conocimientos y paciencia. Somos afortunados todos aquellos que podemos aprender de ti, te mereces todos los buenos proyectos que vengan. A Berta Rivas-Mundiña por introducirme en el interesante mundo de las nanopartículas.

Gracias a mi tutor, Francisco Javier García Lozano por ser el impulso que necesitaba y por darme la bienvenida con entusiasmo a su grupo de investigación. Es un privilegio aprender de profesionales como tú.

Gracias a mi familia, mis padres y hermano; en especial a mi hermana y mis ahijados por ser una red de apoyo y siempre estar orgullosos de mí. Vosotros sois mi verdadero orgullo.

Gracias Yulia por siempre querer lo mejor para mi desde cualquier punto del mundo y ver mi potencial incluso cuando yo no lo hago. A Eva y María por el amor y cariño diario. A mis amigas de aquí y allí, por las eternas charlas y momentos de comprensión.

Gracias a mis compañeros de profesión, en especial a aquellos que se convierten en amigos y acaban enseñándote más de la vida que de odontología. Por muchos años más de aprendizaje.

FINANCIACIÓN

Este estudio ha estado financiado por TERA+ network (RICORS RD24/0014/0040, ISCIII y EU NextGeneration) y por el proyecto 22629/PI/24 de la Fundación Séneca (FSRM).

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Historia de la plata en medicina	8
1.2 La nanotecnología.....	8
1.3 Nanopartículas de plata	9
1.3.1 Aplicaciones de las nanopartículas de plata	10
1.3.2 Morfología y tamaño de las NPsAg	14
1.3.3 Origen y obtención de las NPsAg	15
1.3.4 Nanopartículas de plata en odontología.....	16
1.4 Antisépticos en terapéutica dental	21
1.5 Efectos de las NPsAg en la biocompatibilidad	27
1.6 NPsAg como antiséptico dentinario.....	29
1.7 Justificación.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
3. MATERIAL Y MÉTODO	33
3.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	35
3.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR.....	35
3.2.1 Extracción de pulpa dental	36
3.2.2 Disgregación enzimática	37
3.3 TRIPSINIZACIÓN	39
3.4 CARACTERIZACIÓN.....	40
3.5 RECUENTO CELULAR	41

3.6 ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD	42
3.6.1 Análisis de la concentración de inhibición media	42
3.6.2 Análisis actividad metabólica	45
3.6.3 Ensayo de la migración celular	45
3.6.4 Ensayo de la inmunofluorescencia	46
3.6.5 Ensayo de medición de las especies reactivas de oxígeno intracelular	49
3.6.6 Ensayo de apoptosis/necrosis	51
3.6.7 Ensayo de ELISA	52
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
4. RESULTADOS	55
4.1 Caracterización celular	55
4.2. Análisis de la concentración de inhibición media	56
4.2 Análisis de la actividad metabólica	57
4.3 Ensayo de la migración celular	60
4.4 Ensayo de inmunofluorescencia	62
4.5 Ensayo de apoptosis/necrosis	63
4.6 Ensayo de la medición de especies reactivas de oxígeno intracelular	65
4.7 Ensayo de ELISA	66
5. DISCUSIÓN	69
5.1 Uso de las NPsAg como antiséptico	69
5.2 El tamaño de las NPsAg	70
5.3 Morfología de las NPsAg	71
5.4 La carga superficial de las NPsAg	73
5.5 Dosis total y la concentración de NPsAg	75
5.6 Ensayo de actividad metabólica	76
5.7 Ensayo de migración celular	77

5.8 Ensayo de ROS.....	78
5.9 Ensayo de inmunofluorescencia	79
5.10 Ensayo de apoptosis/necrosis.....	80
5.11 Ensayo de medición de citoquinas	81
5.12 Limitaciones del estudio y perspectivas futuras.....	82
- Limitaciones del estudio	82
- Perspectivas futuras.....	82
6. CONCLUSIONES.....	85
7. REFERENCIAS	87
8. ANEXOS	105
ANEXO 1. Informe del Comité de Bioseguridad en experimentación.	105
ANEXO 2. Informe de evaluación de la Comisión de Ética de Investigación. ...	106
ANEXO 3. Declaración de consentimiento informado para pacientes.	108
ANEXO 4. Hoja de información a la persona participante	109
ANEXO 5. Documento especificaciones de NPsAg MG-85	110
ANEXO 6. Documento especificaciones de NPsAg MG-89	111

RESUMEN

Introducción: Las nanopartículas de plata (NPsAg) son un material con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivíricas, desarrolladas por la nanotecnología y con amplias aplicaciones en la medicina. Su tamaño, forma, carga y recubrimiento son algunos de los factores relevantes en su actuación sobre los microorganismos y que se encuentran en estudio para conocer su funcionamiento. Su aplicación en la odontología incluye recubrimientos de implantes, desinfección de conductos en endodoncia, refuerzo de materiales protésicos y membranas para cirugías orales, entre otras. La posible aplicación de las NPsAg como material de desinfección cavitaria, manifiesta la necesidad de conocimientos sobre su biocompatibilidad con las células pulpares, así como su comparativa con otros materiales ya presentes en el mercado.

Objetivo: Analizar la biocompatibilidad y citotoxicidad de dos tipos de NPsAg, MG-89 y MG-85, con tamaños diferentes y morfologías similares, para comprobar qué dosis son compatibles con células pulpares mesenquimales y si existe diferencias entre ambos materiales.

Material y métodos: Para este estudio de biocompatibilidad se utilizaron dos muestras de NPsAg, MG 89, de morfología esférica y de tamaño $3,67 \pm 1,06$ nm; y MG 85, de morfología quasi-esférica y de tamaño $18,83 \pm 8,86$ nm. Los ensayos llevados a cabo fueron: análisis de la concentración de inhibición media (IC_{50}), análisis de la actividad metabólica (MTT) (24, 48, 72 horas), ensayo de la migración celular (24, 48, 72 horas) (cierre de herida), ensayo de inmunofluorescencia (72 horas), medición de las especies reactivas de oxígeno (ROS), ensayo de apoptosis/necrosis (Anexina V/PI) y ensayo de liberación de citoquinas (ELISA para la producción de IL-6 e IL-8). El análisis estadístico se realizó por vía ANOVA unidireccional y la prueba post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados: Los resultados mostraron un IC_{50} de 29,9 $\mu\text{g/ml}$ para MG-89, mientras que para MG-85 fue de 21,01 $\mu\text{g/ml}$ por su mayor citotoxicidad. La actividad metabólica se

vio afectada en ambos materiales en concentraciones de 50 µg/ml y 25 µg/ml, aunque la viabilidad celular era similar al control en concentraciones inferiores a 5 µg/ml. La migración celular y morfología mostraron resultados equiparables al control para MG-89 cuando las concentraciones eran inferiores a 10 µg/ml. La producción de ROS aumentó para todas las muestras de manera estadísticamente muy significativa desde las dosis más bajas. El ensayo de apoptosis/necrosis muestra una tendencia a una apoptosis programada celular en concentraciones altas, con desplazamiento gradual a necrosis cuando se reduce la concentración. Los resultados de ELISA para la producción de IL-6 e IL-8, indican una respuesta similar al control en todas las concentraciones a excepción de 50 µg/ml y 25 µg/ml, donde la producción de citocinas aumenta para MG-85 y disminuye para MG-89.

Conclusiones: La muestra de NPsAg MG-89 presentó mejores resultados en biocompatibilidad y menos efectos inflamatorios cuando se comparó con MG-85 en celulares mesenquimales de pulpa dental. Los resultados mostraron que únicamente dosis bajas de ambos materiales presentan resultados similares a los del control, siendo esta equivalencia mayor para aquellas NPsAg de menor tamaño y morfología regular (MG-89). La posible respuesta antiinflamatoria de la MG-89 en la concentración de 25 µg/ml, siembra el interés por futuras investigaciones *in vitro* que permitan dilucidar posibles usos e inclusión en materiales dentales.

PALABRAS CLAVE

Nanopartículas de plata, antiséptico dentinario, células mesenquimales de pulpa, biocompatibilidad, odontología restauradora.

ABSTRACT

Introduction: Silver nanoparticles (AgNPs) are nanomaterials developed through nanotechnology with wide applications in medicine, including antimicrobial, antibacterial, antifungal and antiviral properties. Relevant factors such as: size, shape, surface charge and coating, are relevant factors in their antimicrobial activity and topic of investigation for a better understanding of their action mechanism. In dentistry, AgNPs have been widely used for implants coating, root canal disinfection in endodontics, prosthetic materials or membranes for oral surgeries, among other applications. The use of AgNPs as a potential cavity disinfectant, highlights the need to evaluate their biocompatibility with dental pulp stem cells and to compare them with other materials available on the market.

Objective: To analyse the biocompatibility and cytotoxicity of two types of AgNPs, MG-89 and MG-85, presenting different sizes but similar morphologies; in order to determine the doses compatibles with dental pulp stem cells and whether differences exist between both materials.

Material and methods: Two samples of AgNPs were used for this biocompatibility study: MG-89, spherical morphology and size $3,67 \pm 1,06$ nm; and MG-85 size $18,83 \pm 8,86$ nm and quasi-spherical morphology. The assays performed included: half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}), metabolic activity (MTT) (24, 48, 72 hours), cell migration (24, 48, 72 hours) (wound healing), measurement of reactive oxygen species (ROS), apoptosis/necrosis assay (Annexin V/PI), immunofluorescence and inflammatory cytokine release (ELISA for IL-6 and IL-8 production). Statistical analysis was carried out via on-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p < 0,05$).

Results: The results for the IC_{50} test were $29,9 \mu\text{g/ml}$ for MG-89, whereas for MG-85 showed $21,01 \mu\text{g/ml}$, indicating higher citotoxicity for the last one. Metabolic activity was reduced in both materials at concentrations of $50 \mu\text{g/ml}$ and $25 \mu\text{g/ml}$, although cell viability was comparable to the control results at concentrations below $5 \mu\text{g/ml}$. Cell migration and morphology showed results similar to the control for MG-89 at

concentrations below 10 µg/ml. ROS production increased significantly in all samples, even at the lowest doses. The apoptosis/necrosis assay revealed a predominance of programmed apoptosis at higher concentrations, with a gradual shift towards necrosis when concentrations were lowered. ELISA results for cytokines production indicated a similar response to control at all concentrations, except for 50 µg/ml and 25 µg/ml, where IL-6 and IL-8 production increased for MG-85 and decreased for MG-89.

Conclusions: The sample MG-89 demonstrated higher biocompatibility and fewer inflammatory effects when compared to MG-85 in dental pulp stem cells. These findings show that only low doses produce results similar to the control, with this equivalence being more evident for the smaller and more regularly shaped AgNPs (MG-89). The possible anti-inflammatory response in MG-89 at 25 µg/ml raises the interest for further *in vitro* studies to explore potential applications and incorporation into dental materials.

KEY WORDS: silver nanoparticles; dentin disinfectant; dental pulp stem cells; biocompatibility; restorative dentistry.

ABREVIATURAS

- **Ag⁰**: Plata metálica.
- **Ag⁺**: Plata catiónica.
- **ATP**: Adenosín trifosfato.
- **BAC**: Cloruro de benzalconio.
- **BSA**: Albúmina sérica bovina.
- **CHX**: Clorhexidina.
- **DAPI**: 4'6-diamino-2-fenilindol.
- **EDTA**: Ácido etilendiaminotetraacético.
- **EFSA**: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
- **ELISA**: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.
- **FACS**: clasificación celular activada por fluorescencia.
- **H1N1**: Virus influenza A.
- **HBV**: Virus de la Hepatitis B.
- **HPIV**: Virus de parainfluenza Humano.
- **HPV**: Virus del Herpes simple.
- **IL-6**: Interleucina 6.
- **IL-8**: Interleucina 8.
- **ISO**: Organización Internacional de Normalización.
- **ISTC**: Sociedad Internacional de Terapia Celular.
- **MIC**: Concentraciones mínimas inhibitorias.
- **MSCs**: Células mesenquimales de pulpa dental.
- **MRSA**: Staphylococcus Aureus resistente a metilicina.
- **MTA**: Agregado de trióxido mineral.
- **NaCl**: Hipoclorito de sodio.
- **NP**: Nanopartícula.
- **NPs**: Nanopartículas.
- **NPsAg**: Nanopartículas de plata.
- **PBS**: Solución salina tamponada con fosfato.
- **PEEK**: Polieteracetona.
- **PEI**: Polietilenimina.
- **PET**: Tomografía de positrón-emisión.
- **PMMA**: Polimetilmetracrilato.

- **PVP:** Polivinilpirrolidona.
- **PVP-I:** Povidona iodada.
- **ROS:** Especies reactivas de oxígeno.
- **RTG:** Regeneración tisular guiada.
- **SDF:** Diamina fluorada de plata.
- **SPECT:** Tomografía computada por la emisión de un único fotón.
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa.
- **ZOE:** Óxido de Zinc eugenol.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los mecanismos de las NPsAg frente a la bacteria (2).	12
Figura 2. Efectos antibacterianos de las NPsAg (36).....	13
Figura 3. MG-85 bajo microscopio de transmisión de electrones.....	34
Figura 4. MG-89 bajo microscopio de transmisión de electrones.....	35
Figura 5. Cabina Telstar Bio II A.	36
Figura 6. Centrífuga Heraeus, Thermo Fisher Scientific.	38
Figura 7. DMEM alto en glucosa (Biowest).....	40
Figura 8. Contador con resultados de la muestra.....	41
Figura 9. Faloidina, (Life Technologies, Willow Creek Road, Oregon, EE. UU.)	48
Figura 10. DAPI (4,6-diclorhidrato de diamino-2-fenilindol)	49
Figura 11. Fenotipo células madre de pulpa dental.	55
Figura 12. Representación gráfica de curva IC ₅₀ para ambos materiales.	56
Figura 13. Proliferación celular con concentración de 50µg/ml	57
Figura 14. Proliferación celular con concentración de 25 µg/ml.....	58
Figura 15. Concentración de 10 g/ml para MTT	58
Figura 16. Concentración de 5 g/ml para MTT	59
Figura 17. Proliferación celular con concentración de 1 g/ml.....	59
Figura 18. Representación del experimento de migración celular para MG-89 y MG-85 con gráfica descriptiva por porcentaje.	60
Figura 19. Fluorescencia de las células sometidas a los tratamientos de MG-85 y MG-89 con diferentes concentraciones y el control.....	62
Figura 20. Citometría de flujo para el análisis de la necrosis/apoptosis celular para lo MG-85 y MG-89.	63
Figura 21. Histograma de fluorescencia (CM-H2DCFDA) del análisis de especies reactivas de oxígeno.	65
Figura 22. Gráfica para los resultados del ELISA en IL-6 para MG-85 y MG-89 y sus diferentes concentraciones.	66
Figura 23. Gráfica de análisis resultado de un ELISA en IL-8 para los dos materiales en sus distintas concentraciones.....	67

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la plata en medicina

La plata es un material utilizado tradicionalmente en medicina por sus diversas ventajas y propiedades antibacterianas, antimicrobianas y antiinflamatorias. Es frecuentemente utilizada en tratamientos de infecciones en materiales como los vendajes y apósitos para el tratamiento de heridas y quemaduras con el objetivo de prevenir infecciones y acelerar la cicatrización (1). Tras la aparición de los antibióticos pasó a un segundo plano, viéndose de nuevo en auge debido a la problemática producida por las resistencias bacterianas, que potenciaron su uso, especialmente con la emergencia de la nanotecnología (2).

Este material lo podemos encontrar en dispositivos médicos como catéteres, en los que se utiliza como revestimiento para evitar infecciones del tracto urinario; en implantes del tipo prótesis de cadera, válvulas cardíacas e incluso implantes dentales; además de tratamientos frente al cáncer, debido a su mecanismo de acción apoptótico frente a células tumorales (3, 4).

En odontología utilizamos materiales con plata como, por ejemplo, la amalgama tradicional, el citrato de plata, el fluoruro de plata, la plata coloidal y más recientemente, las nanopartículas de plata (5).

1.2 La nanotecnología

La nanotecnología ha supuesto un nuevo campo de investigación ya que proporciona materiales con versatilidad de aplicación. A partir de esta surge la nanomedicina, definida como la aplicación de la nanotecnología para el tratamiento, diagnóstico, control y monitorización de sistemas biológicos. La repercusión de los materiales utilizados gracias a esta tecnología para detección o tratamiento de enfermedades como el cáncer o el Alzheimer es cada vez más relevante (6).

Se define una nanopartícula (NP) como “un material de origen natural, accidental o manufacturado en estado no consolidado, como un agregado o conglomerado donde el 50 % o más de las partículas se encuentran en una distribución de tamaño de rango entre 1-100 nm” (7).

Las nanopartículas (NPs) pueden ser introducidas en nuestro cuerpo por distintos métodos como son: ingestión, inyección, aplicación tópica o inhalación. Esto condicionará la ruta por la que alcanzará su objetivo y los órganos que se verán afectados durante su distribución; es por ello importante conocer cuáles son los efectos a corto y medio plazo que producen y en qué lugares pueden desarrollar su potencial (8).

La nanomedicina derivada de la nanotecnología precisa de conocimientos como son los mecanismos de acción y patofisiología de cada enfermedad para saber cuál es el objetivo específico a tratar; conocer las propiedades físicas de las NPs en detalle y sus mecanismos de acción para poder manipularlas de manera adecuada; así como obtener información química sobre los nuevos sistemas de uso de isótopos y partículas (teragnósticos) para poder modificar su biocompatibilidad (8).

1.3 Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (NPsAg) han captado una considerable atención en la medicina debido a sus propiedades únicas y su amplio espectro de aplicaciones (9). Su tamaño ultrapequeño, su ratio área de superficie frente a masa y características físicas y químicas, las hacen ideales para su uso en odontología, ya que se trabaja en superficies de pequeño tamaño que necesitan materiales altamente precisos (10).

Las NPsAg son iones de plata con alta carga positiva (multicatiónica y multiiónica) (11), lo que favorece su interacción con las superficies con carga negativa de las bacterias, resultando en mejores efectos antimicrobianos (12). Durante su desarrollo y estudio, se han combinado con polímeros o utilizado en superficies con biomateriales, obteniendo incluso mejores resultados con relación a su estabilidad, tiempos de liberación y demás características físicas (13).

El reducido tamaño de las partículas permite su uso en diferentes campos de la biología y ciencia, despertando especial interés la plata por sus propiedades antimicrobianas conocidas desde la antigüedad (14).

El estado químico de la plata varía entre: plata catiónica (Ag^+), plata metálica (Ag^0) y plata II (Ag^{2+}); así como puede presentarse en estado físico fluido o acuoso. Además de transformarse por aglomeración, disolución o especiación química (15).

La tecnología ha permitido desarrollar NPsAg de diferentes formas y tamaños de partículas que tienen distintos mecanismos de acción. Además, ofrecen la ventaja de someter al organismo a una baja exposición al material mientras que se concentran de manera muy localizada en las células diana, eliminando así, algunos de los efectos secundarios que se asocian a su posible toxicidad (8). Recientemente se ha demostrado que el tamaño microscópico de las partículas permite una mayor penetración tubular y liberación más lenta de la plata, lo que se traduce en una menor citotoxicidad (5).

1.3.1 Aplicaciones de las nanopartículas de plata

Algunas de las aplicaciones de las NPsAg se pueden agrupar en las siguientes áreas:

- Herramienta diagnóstica

Existen diferentes métodos de diagnóstico de imagen que se encuentran en evolución gracias a las NPsAg. Algunos de los más comunes son la bioluminiscencia, la imagen por fluorescencia reflectante, la tomografía positrón-emisión (PET) o la tomografía computada por la emisión de un único fotón (SPECT); siendo estas dos últimas las que presentan mayor sensibilidad frente al resto de técnicas (16, 17).

La posibilidad de utilizar estas herramientas *in vivo* nos proporciona la capacidad de obtener diagnósticos precoces o de observar de manera más efectiva el estado de avance de la enfermedad en metástasis de cáncer, por ejemplo, y así controlar la eficacia del tratamiento e incluso intervención quirúrgica que se esté efectuando (18). Estos

métodos precisan de tres características para ser ideales para su uso, estas son: ser no invasivas, tener alta sensibilidad y proporcionar información objetiva (16).

- Administración de fármacos

La capacidad de las NPsAg para transportar el medicamento deseado al lugar específico posibilita una reducción en la dosis y disminución en los efectos secundarios que estos producen al organismo, además de reducir el coste. En el caso de los tratamientos para el cáncer, con este método se puede depositar el fármaco antineoplásico directamente en el tejido canceroso (8).

Esto también se consigue con los nanovehículos, diseñados para acumularse en el tejido diana para ejercer una función específica, incrementar la función terapéutica mientras reducen la toxicidad (19).

Algunos de los objetivos principales para los que se diseñan este tipo de fármacos son, por ejemplo:

- Disminuir los efectos negativos producidos por los tratamientos convencionales debido a una mayor concentración en el tejido diana.
- Optimizar farmacocinética y farmacodinámica, biocompatibilidad y biodegradabilidad.
- Minimizar la cantidad de fármaco circulante en el organismo.
- Mejorar la estabilidad del fármaco.
- Conseguir mejor absorción celular e intracelular.
- Proporcionar diferentes rutas de acción cambiando su solubilidad (19).

El interés de estos fármacos radica principalmente en que pueden reducir los efectos secundarios producidos en el organismo por su liberación directa en el tejido u órgano diana, contrariamente a lo que ocurre con los fármacos antineoplásicos, por ejemplo (20).

- Medicina regenerativa

La medicina regenerativa consiste en la creación, reparación o mejora de tejidos. La aplicación de las NPsAg en el ámbito de la regeneración se lleva a cabo mediante el uso

y combinación de estas con células y materiales como matrices extracelulares para ayudar, por ejemplo, en reparaciones de lesiones tendinosas (21). Las NPsAg son utilizadas también en materiales como hidrogeles (14) o apósitos que favorecen la cicatrización y la angiogénesis, la cual se ve favorecida por la plata gracias a su potencial de diferenciación en células mesenquimales de osteoblastos (22).

La nanomedicina nos permite controlar o regular células del tamaño de micras y matrices extracelulares. Los tratamientos de NPsAg con células madre son los más prometedores ya que nos permiten conocer mejor el desarrollo, funcionamiento y destino de las células; así como la interacción que se produce entre ellas. Todo ello conduce a un mejor conocimiento de las NPsAg y sus propiedades, que permite guiar de manera más adecuada la regeneración de tejidos (23, 24).

- Efectos bactericidas:

Las NPsAg tienen la capacidad de acumularse en las membranas celulares provocando cambios estructurales, lo que hace a las bacterias más permeables (25). También previenen la duplicación del ADN y la expresión de los ribosomas y otras proteínas celulares, además de con los ciclos de transferencia de energía (26).

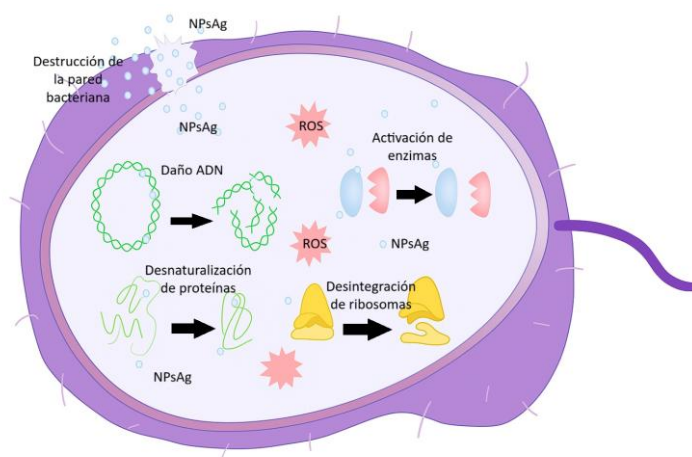


Figura 1. Representación de los mecanismos de las NPsAg frente a la bacteria (2).

Las NPsAg han demostrado ser efectivas frente a numerosas bacterias tales como *Staphylococcus aureus* (27), *Escherichia coli* (28) y *Pseudomonas aeruginosa* (29). Siendo

más letales frente a bacterias gram negativas que positivas por la presencia de polisacáridos a los que se unen de manera más específica (13).

Se ha estudiado que las NPsAg pueden afectar a las bacterias de la siguiente manera: destruyendo la membrana bacteriana y favoreciendo su filtración; generando especies reactivas de oxígeno e inactivando la cadena respiratoria; destruyendo el ADN y bloqueando su replicación; también desnaturalizando las proteínas e inactivando las enzimas (2). Las propiedades bactericidas de las nanopartículas impiden la unión y formación de biofilm bacteriano, lo que supone una gran ventaja en los materiales dentales (13).

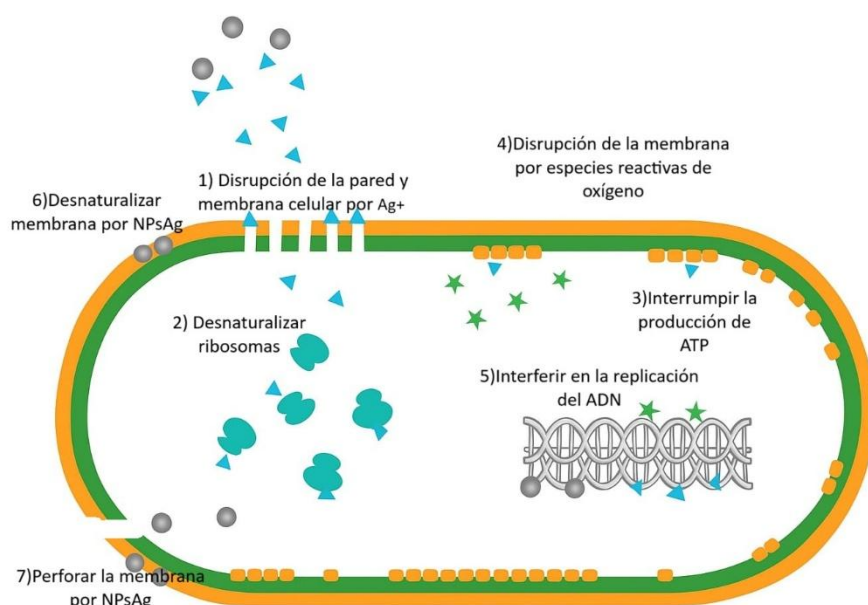


Figura 2. Efectos antibacterianos de las NPsAg (36).

- Antifúngicas:

Las NPsAg han evidenciado ser eficaces frente a *Candida Albicans* y otros hongos como *Monilinia sp.* El mecanismo de acción de estas está basado en crear sensibilidad en los receptores de los hongos, de manera que se unen donde deberían hacerlo ácidos grasos como el oleico. De esta manera, interfieren en la morfogénesis de la

hifa del hongo que otorga la patogenicidad a este, viéndose de esta manera inactivados (30).

- Antivíricas:

Se ha demostrado que las nanopartículas de plata inhiben la replicación de diferentes virus, lo que las hace útiles en la prevención y tratamiento de infecciones virales. Algunos de estos virus son el virus de la hepatitis B (HBV) (31), el virus de parainfluenza humano (HPIV) (32), el herpes simple (HPV) (33) o el virus influenza A(H1N1) (34). Mostrando, además, mayor efectividad cuanto menor es el tamaño de las NPsAg (menor a 10 nm) por su mayor adherencia y área de acción (30).

- Antiinflamatorias:

El proceso inflamatorio viene señalado por marcadores químicos como prostaglandinas, factor del complemento o interleucinas, entre otros. Las NPsAg han probado su capacidad de reducir estos marcadores en fases tempranas de la cicatrización (35). Algunas de origen biológico han demostrado la reducción de citoquinas causadas por la radiación UV-B, así como del edema y citoquinas en ensayos con tejido animal (36).

1.3.2 Morfología y tamaño de las NPsAg

Las NPsAg pueden ser sintetizadas con diversas morfologías, lo que puede traducirse en distintos efectos biológicos. Algunas de ellas son: esféricas, en forma de barra, octogonales, hexagonales, triangulares o con forma de flor (13).

La división por tamaños proporciona tres categorías que son: materiales en bloque, coloides tradicionales o nanopartículas de plata. Estas últimas, a su vez, pueden clasificarse como metálicas o iónicas, siendo las iónicas compuestos de plata insoluble como el bromuro de plata y el óxido de plata (37, 38).

Un tamaño pequeño de nanopartícula supone un mayor poder de penetración y área de acción, lo que puede resultar en mayor toxicidad. También la cubierta o superficie de la

nanopartícula es determinante, ya que afecta a la carga de estas y por tanto a factores como el tiempo de permanencia en el sistema sanguíneo. A su vez, pueden penetrar las estructuras tubulares de la dentina, lo que le proporciona mayor tiempo y superficie de liberación, así como menos concentración por lo que generan menos toxicidad (5).

1.3.3 Origen y obtención de las NPsAg

Los métodos de síntesis de las nanopartículas pueden agruparse en tres grupos diferentes en función a la metodología empleada: métodos químicos, métodos físicos y métodos biológicos.

Los métodos químicos incluyen la reducción química, las técnicas electroquímicas, la pirólisis y el método químico asistido de irradiación. Para llevar a cabo la síntesis de estas se usan metales precursores y agentes reductores y estabilizadores. Algunos de los agentes reductores son alcohol, ácido ascórbico o citrato de sodio. La técnica de pirólisis permite, por ejemplo, un control más adecuado del tamaño y contenido de plata (39).

Las ventajas de los métodos físicos son que no incluyen productos químicos o tóxicos que puedan dejar residuo y que suelen requerir menos tiempo para manufacturarse, aunque se consume una gran cantidad de energía en su producción. Algunos ejemplos son condensación química de vapor; la descarga por arco eléctrico, que consiste en la generación de un arco eléctrico entre dos electrodos conductores; el método de fresado de bolas de energía o la pulverización catódica por magnetron de corriente continua (39).

Los métodos biológicos se basan en el uso de moléculas no tóxicas producidas por microorganismos vivos que actúan como enzimas reductoras y no reductoras. Su mayor ventaja es que son respetuosas con el medio ambiente. Algunos de los microorganismos utilizados son bacterias, hongos y levaduras (40).

1.3.4 Nanopartículas de plata en odontología

Las NPsAg presentan diferentes aplicaciones en las siguientes áreas de la odontología:

- **Resinas compuestas**

Las amalgamas dentales han sido el método de obturación dental tradicional hasta que se desarrollaron los composites, que presentaban diversas ventajas frente a estas. En estudios comparativos de las amalgamas con los ionómeros de vidrio y los composites, las primeras demostraron tener un mejor efecto antimicrobiano gracias a la presencia de la plata (41). Es por ello por lo que posteriormente se han desarrollado resinas compuestas con partículas de plata que han mostrado gran eficacia frente a *S.Mutans* y *Lactobacillus* (42).

Es también relevante la adición de NPsAg a los adhesivos dentinarios que podría mejorar el efecto antimicrobiano sin afectar a las fuerzas de unión ya que preserva la interfase diente-adhesivo alargando la vida de la restauración (43).

- **Ortodoncia**

El uso de la plata se ha mostrado favorable en su adición a adhesivos de ortodoncia y brackets debido a la frecuente aparición de lesiones de mancha blanca asociada al uso de estos. La adición de plata a las resinas para cementado de los retenedores ha demostrado ser eficaz en la prevención de caries (44).

- **Tratamiento de caries**

Las propiedades antimicrobianas de la plata la han hecho candidata para su uso en tratamiento de caries ya activas y aquellas lesiones incipientes tradicionalmente tratadas con barnices de flúor (45). El fluoruro diamino de plata (SDF) se utiliza como barniz que previene y detiene lesiones de caries gracias a la plata iónica, el fluoruro y el amonio (46).

- **Aplicación en endodoncia**

▪ Irrigante

El uso de irrigantes tradicionales como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), hipoclorito de sodio (NaCl) y clorhexidina (CHX) presentan la desventaja de provocar citotoxicidad en el tejido periapical o retirada inadecuada del *biofilm* bacteriano y barrillo dentinario (47). Sin embargo, algunos autores afirman que el uso de las NPsAg como irrigante ha demostrado un mayor efecto antimicrobiano, menor citotoxicidad e incluso mejor resistencia a la fractura de instrumentos cuando se comparaba con el hipoclorito de sodio (48).

▪ Medicación intraconducto y desinfectante de gutapercha

La plata se ha utilizado como medicación intraconducto junto a la pasta de hidróxido de calcio mejorando su efecto antibacteriano (49). De la misma manera, se ha combinado con el agregado de trióxido mineral (MTA) y un nuevo cemento experimental, el cemento rico en calcio (CEM), mejorando tanto su biocompatibilidad, como su fuerza mecánica y actividad antimicrobiana (50).

En el caso de la gutapercha, cuando se usan concentraciones pequeñas de NPsAg como desinfectante, se evita el problema del deterioro físico que se produce al usar hipoclorito de sodio (50).

▪ Sellador de conductos

Los investigadores han incorporado vanadato de plata en selladores endodónticos como: selladores de base de resina con metacrilato (Real Seal®/EndoRez®), óxido de zinc eugenol (ZOE), selladores de base resinosa con epoxy (AH Plus®) y con base de hidróxido de calcio (Apexit®). Esto ha permitido una mejor efectividad frente a *E. Faecalis*, *P. auruginosa* y *E. coli* sin reducir sus propiedades mecánicas (51-54).

Estos selladores proporcionan la inhibición del *biofilm* y previenen infecciones debido a su capacidad de penetración y de sellado, además de la inhibición de formación de población bacteriana en el periápice (55).

- Periodoncia

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria que produce la pérdida de hueso y tejido de inserción que es tratada mediante tartrectomías y raspados y alisados radiculares. En ocasiones se combina este tratamiento con antibióticos para mejorar su efectividad. Es, en estos casos, en los que se ha demostrado la actividad sinérgica que presentan las NPsAg en concentraciones muy por debajo de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) utilizadas en antibióticos en solitario (56).

Las NPsAg han demostrado también promover la regeneración tisular mediante la producción de colágeno y neovascularización durante la formación de nuevo tejido gingival, cuando se utilizó con membranas en cirugías periodontales (57). Incluso se ha probado su uso para la disminución de la colonización de las bacterias en membranas para regeneración tisular guiada (58) y en membranas de fibrina que contienen glóbulos blancos y plaquetas, lo que mejora sus propiedades mecánicas y actividad antimicrobiana (59).

- Prostodoncia

Algunas de las aplicaciones de las NPsAg en prostodoncia son la mejora de las propiedades mecánicas para su uso en materiales como el polimetilmetacrilato (PMMA) utilizado para la realización de prótesis; así como de sus propiedades antimicrobianas frente a hongos, como la *Candida albicans*, muy presentes en dentaduras o materiales provisionales o de rebase. La incorporación de iones de plata en el PMMA supone una mejora de la resistencia a la fractura y a la colonización de este hongo que se encuentra presente en dos tercios de la población portadora de prótesis y es el causante de la estomatitis protésica (60-62).

El cloruro presente en la saliva, en combinación con los iones de plata, suponen un descenso en las propiedades mecánicas protésicas; sin embargo, algunos autores consiguieron aumentar la disponibilidad de plata en los materiales con el uso de clatrato

ácido de plata en una estructura porosa que controlaba la liberación de los iones y, por tanto, su resistencia (63).

Los materiales de impresión, que suponen el método tradicional de toma de medidas de prótesis, precisan de desinfección tras su uso en boca (64); el uso de las NPsAg en estos ha demostrado ser eficaz sin afectar a sus propiedades mecánicas. Además de sus propiedades antibacterianas, las NPsAg han mostrado una mejora de la resistencia a la fractura en coronas y restauraciones porcelánicas por un mayor aumento del módulo de Young (65, 66).

- **Implantes**

Las cirugías de implantes presentan riesgos de contaminación bacteriana (*S. mutans*, *P. gingivalis*), o fúngica (*Candida albicans*) que suponen un riesgo de desarrollo de periimplantitis resultante en pérdida de hueso y, por tanto, de inserción y fracaso del implante. Para ello se desarrolló la posibilidad de cubrir la superficie de los implantes con NPsAg que retrasan el crecimiento de microorganismos (65, 66). La plata es, sin embargo, un material de alta biodegradación, lo que suponía un problema en su uso como material antiséptico. Para salvaguardar esta cuestión, se llevaron a cabo diferentes métodos incorporando NPsAg a materiales como nanotubos de dióxido de titanio, coberturas de biopolímeros como la polidopamina o superficies de titanio tratadas con calcio para mejorar la biocompatibilidad (66).

La osteogénesis en implantes dentales es otra de las ventajas del uso de este material. Uno de los métodos principales que favorecen esta cualidad es cubrir los implantes mediante deposición electroquímica o por la aplicación de material sol-gel que contienen cloruros en las superficies de estos (67).

Otra de las mejoras propuestas para el desarrollo de su capacidad antimicrobiana es la actividad de las NPsAg mediada por fotocátalisis (68). Se ha demostrado que los pilares de implantes que son recubiertos por plata previenen la adhesión y filtrado de microorganismos, como es el caso de la *Candida albicans* (69). También se probó la

capacidad osteogénica y antimicrobiana simultánea alrededor de implantes en aleaciones de acero inoxidable (70).

Además de unida al titanio, la plata ha mostrado ser biocompatible y un potente agente antimicrobiano usado junto a materiales como el PEEK (polieteracetona), muy utilizado para prótesis removibles, pilares provisionales, tapones de cicatrización o provisionales de implantes; debido a su versatilidad y similitud en su módulo de elasticidad, similar al del hueso (71).

Por otro lado, la zirconia recubierta con NPsAg ha probado presentar efectos antimicrobianos frente a patógenos como *Eschericia coli* o *Staphylococcus Aureus*, con la ventaja de no provocar la liberación de iones plata en saliva, disminuyendo su toxicidad. Se demostró, además, que su efecto provenía del contacto directo de las NPsAg con los microorganismo y no de la liberación de los iones de plata catiónica (Ag⁺) de su interior al medio (72).

Por último, en la regeneración tisular guiada (RTG) se utilizan membranas para cubrir el defecto óseo y evitar que se produzca una reabsorción del material. Se ha demostrado la efectividad de las membranas de colágeno recubiertas de plata frente a la actividad microbiana de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; así como la reducción de liberación de citoquinas inflamatorias incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-6. Este material también favorece la diferenciación de células mesenquimales claves en la RTG (73).

- **Cirugía oral**

En lo que a cirugía oral y maxilofacial respecta, la plata ha sido utilizada desde la antigüedad como material de sutura o en apósitos por su ya mencionada biocompatibilidad, esterilidad y baja respuesta inflamatoria (74).

Algunos de sus usos son, por ejemplo, la prevención de alveolitis seca, mejorando la velocidad de cicatrización en alveolos postextracción y reduciendo la aparición de

complicaciones postextracción, lo que permite un menor uso de antibióticos en la práctica diaria (75). Además, existe una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que es predominantemente común en infecciones orales, que se ve disminuida con el uso de esponjas de gelatina con plata (76).

Siguiendo la línea del uso de suturas de plata que ya se llevaba a cabo en 1800, se ha probado la fabricación de suturas cubiertas de NPsAg. Estas presentan fuerte efecto bactericida frente a patógenos como *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, con la ventaja de no perjudicar la viabilidad de los queratinocitos (77-79).

Líneas más recientes de investigación muestran la capacidad de regulación de la microbiota oral por parte de las NPsAg por su capacidad de interferir en el sistema inmune gracias a su efectividad en células de carcinoma oral. Los estudios sugieren que las NPsAg son efectivas frente a *P. anaerobius*, la bacteria dominante inductora de la respuesta inmune anticancerígena y que inhibiría el crecimiento tumoral (80).

1.4 Antisépticos en terapéutica dental

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial. Su origen multifactorial se debe a una interacción entre las estructuras dentales y el *biofilm* que provoca un desbalance entre desmineralización y remineralización, en la que como resultado prevalece la primera. En ella se encuentran presentes bacterias acidogénicas como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*, carbohidratos de rápida fermentación y otros factores dependientes del huésped (81). También los fallos en las restauraciones o la formación de caries secundarias se encuentran provocados por estos microorganismos. Es por ello, que la búsqueda de materiales que proporcionen antisepsia y esterilidad ante organismos patógenos, que puedan atacar a los dientes y que no afecten a la pulpa, desempeña un papel fundamental en la prevención de la caries.

En la búsqueda del material antiséptico que proporcione la mayor reducción de microorganismos presentes en la dentina previos a la obturación y sellado, existen en el

mercado diferentes productos que han sido diseñados o utilizados con este propósito. A continuación, se mencionan algunos de ellos:

- **Hipoclorito de sodio (NaCl)**

Los estudios referentes al hipoclorito de sodio como desinfectante se remontan a los años 20 cuando se comenzó a utilizar para probar su eficacia en tratamientos endodónticos para la eliminación de materia orgánica (82). En esos años se demostró la capacidad esporicida, viricida y notable efectividad en tejidos necróticos frente a los vivos (82, 83).

El funcionamiento de esta solución se basa en la acción del cloruro que, al entrar en contacto con la dentina, se disocia del oxígeno y provoca oxidación sobre las proteínas bacterianas que forman cloraminas, lo que le otorga propiedades antimicrobianas y disolventes del tejido (84). La eficacia es, por tanto, directamente proporcional a la cantidad de cloruro presente en la disolución; y afecta, principalmente, oxidando los grupos sulfhídricos de las enzimas bacterianas causando reacciones metabólicas y consecuentemente, la muerte bacteriana (85).

La aplicación de NaCl sobre la capa híbrida de la dentina produce la descomposición del colágeno presente, ya que tiene un alto componente mineral, disminuyendo la compactación de esta y, por tanto, mejorando la adhesión gracias a una mayor capacidad de penetración de los adhesivos (85).

La concentración más eficiente para conseguir su acción bactericida ha sido estudiada, demostrando las concentraciones del 4 % y 2,5 % ser las más efectivas (86). Además, sus efectos sobre la pulpa refieren efectos antiinflamatorios en las células más superficiales de la pulpa y promueven la curación de esta cuando se utilizaba en concentraciones del 0.04 % (87).

- **Clorhexidina**

El uso de la clorhexidina se justifica por su capacidad de desinfección y desmineralización de la capa mineral de la dentina sin producir daño a las estructuras de colágeno

presentes. La CHX actúa como inhibidora de las metaloproteinasas que degradan la matriz, por lo que puede beneficiar el proceso de adhesión (88). También minimiza la evaporación de agua de la dentina profunda, impidiendo el colapso de las fibras de colágeno (85).

En cuanto a su actividad antimicrobiana, ha demostrado ser bactericida en concentraciones altas y bacteriostática en concentraciones bajas (89). El tiempo de aplicación también es un factor determinante, aunque, en su mayoría, el recomendado es de 60 segundos. Además, el digluconato de CHX al 2 % es biocompatible y puede ser utilizado en procedimientos de recubrimiento pulpar directo e indirecto (90).

La CHX es, sin embargo, más efectiva frente a bacterias gram positivas que frente a gram negativas. Es por ello que su uso se recomienda mayormente para desinfección de cavidades en dientes vitales y como coadyuvante en tratamiento endodóntico (91). La CHX ha demostrado tasas de éxito similares a NaCl frente a *Enterococcus faecalis*, aunque penetración en los túbulos dentinarios es menos eficiente en comparación con NaCl (92). Además, su porcentaje de uso recomendado más eficiente es del 2 % y del 0,2 % (86).

- **Cloruro de benzalconio**

El cloruro de benzalconio (BAC) es un compuesto de amonio cuaternario que presenta actividad bactericida. Utilizado como desinfectante y tensioactivo, es también inhibidor de la actividad viral (93).

Su uso en productos como el Tubulicid® rojo en combinación con el EDTA y con fluoruro de sodio, es utilizado para desinfectar el diente sin eliminar la capa híbrida. Su eficacia ha sido demostrada frente a *S. mutans*, *Streptococcus Salivarius* y *S. Aureus*, aunque con menor eficacia que la CHX (94).

Algunos estudios han demostrado que es biocompatible con células de pulpa y que su influencia en los tratamientos restauradores es positiva debido a su efecto inhibidor de

las metaloproteinasas cuya presencia interfiere negativamente en la adhesión. Las investigaciones revelan que cualquier concentración de BAC mejora la estabilidad de la adhesión, tanto con los grupos de adhesivos de grabado parcial como total, en un periodo de 18 meses. Los efectos secundarios derivados de su uso incluirían una reacción alérgica, así como toxicidad cuando es utilizado en concentraciones superiores al 10 % (95).

- **Peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un agente que produce en los tejidos oxidación y presenta propiedades antibacterianas. En odontología ha sido usado tradicionalmente para irrigación y desinfección de cavidades, así como también está presente en los blanqueamientos dentales (96).

La liberación de oxígeno cuando se pone en contacto con el tejido orgánico provoca la formación de burbujas que ayuda a eliminar bacterias y detritos. Además, ejerce un efecto mecánico que descompone el tejido necrótico y residuos presentes en los canales o superficies dentinarias (97).

Las concentraciones utilizadas son distintas en función a su uso: en los casos de desinfectante dentinario, usualmente se utiliza a una concentración del 3 %; mientras que en los casos de blanqueamientos hasta un 35 % es aplicado en la superficie dental. También es utilizado como tratamiento coadyuvante periodontal en los casos de gingivitis ulceronecrosante aguda o como irrigante subgingival en concentraciones de 1.5-3 %. Este tratamiento no debe ser utilizado en un porcentaje superior al 6 % como se expresó en el Comité Científico de la Unión Europea Sobre Productos de Consumo (SCCP) (98).

Los estudios realizados sobre su utilización en cavidades dentinarias destacan la posibilidad de provocar radicales libres, especies reactivas de oxígeno. Esto es señal de daño celular, especialmente producido cuando la dentina se encuentra muy adelgazada

o permeable, a lo que contribuye la pérdida de colágeno que provoca la desmineralización de la superficie y afecta a la adhesión de resinas (99, 100).

- **Chitosán**

El chitosán es un polímero insoluble en agua policationico que se origina a partir de la desacetilación de la quitina presente en las conchas de crustáceos dando lugar a un polisacárido. Este producto presenta carga naturalmente positiva ($-NH_3^+$), lo que facilitará su interacción con las membranas celulares y bacterianas otorgándole así, capacidad antimicrobiana, bactericida y bacteriostática funcionando, además, como inhibidor de la síntesis de ARN y ADN (101).

En dentina ha demostrado presentar mayor biocompatibilidad que otros como el NaCl o el EDTA, exhibiendo mejor inhibición de biofilm bacteriano que estos (102). También ha sido utilizado como irrigante en endodoncia, demostrando conservar mejor la capa mineral que el EDTA por una menor alteración del equilibrio calcio-fosfato (103).

Algunos estudios demuestran actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas, principalmente por su interacción con la membrana. Su efectividad ha sido comprobada frente a bacterias como *S. mutans* o *Enterococcus faecalis* y hongos como la *Candida albicans* (104).

- **Desinfectantes de base yodada (Ioduros)**

Los desinfectantes de yoduro provocan efectos en un amplio rango de microorganismos, entre ellos, efectos antibacterianos. Estos desinfectantes pueden aparecer en diferentes fórmulas, pero la más común es la povidona yodada (PVP-I). Se considera un bactericida biocida porque ayuda a controlar el nivel bacteriano atacando las proteínas, nucleótidos y ácidos grasos de éstas. Es un revelador y eliminador de placa con potencial frente a bacterias cariogénicas (105).

En cuanto a sus efectos en la adhesión producen huecos que podrían favorecer la filtración e interfieren negativamente a ésta. Además, también está contraindicado su

uso en embarazadas y pacientes con patología tiroidea por su capacidad de provocar complicaciones metabólicas (106).

- **Láser**

El láser es un dispositivo que emite luz amplificada mediante la estimulación por radiación. Existen diferentes tipos de láser que pueden clasificarse en: láseres en estado sólido (Er: Yag); de gas (dióxido de carbono); o de semiconductores (diodos). En odontología tienen múltiples aplicaciones clínicas, entre ellas el blanqueamiento dental, la desinfección, el corte de tejidos duros y blandos, la coagulación, entre otras (107).

Su efecto antibacteriano se basa en la producción de la expansión del agua intratubular y disrupción térmica que lleva las bacterias a su lisis. La terapia fotodinámica ha demostrado ser efectiva frente a bacterias *S. mutans* y *Lactobacillus* reduciendo la viabilidad de éstas, así como la eliminación de la capa híbrida (108, 109).

- **Ozono**

El ozono es un gas inestable formado por 3 moléculas de oxígeno que sufren fotodisociación en moléculas de oxígeno activas, para así reaccionar con otras moléculas. El ozono presenta poder oxidante y provoca disrupciones en la pared celular y en la membrana citoplasmática. Para el uso odontológico se puede encontrar en tres estados: acuoso, aceitoso y gaseoso (110).

En su uso con bacterias de la microbiota oral destaca su eficacia frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*, especialmente cuando alcanza un tiempo de uso de 60 segundos y en lesiones de caries primaria (111).

Los efectos que produce el ozono sobre el esmalte han demostrado ser positivos, incrementando incluso la fuerza de adhesión en este y mejorando la adaptación de los selladores. Por lo que está recomendado como aplicación profiláctica. En relación a la dentina, no ha demostrado interferir en la adhesión ni microfiltraciones; además de

encontrarse al mismo nivel de efectividad cuando es comparado con la clorhexidina, el hipoclorito de sodio o el BAC (112).

- **EDTA**

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es un ácido orgánico que actúa como agente quelante interaccionando con iones metálicos como el calcio (Ca^{2+}). Sus propiedades otorgan a este material una acción desmineralizante de la sustancia orgánica, por lo que es utilizado en una concentración del 17% para la irrigación de conductos en tratamientos de endodoncia, por su capacidad de eliminación del barrillo dentinario producido durante la instrumentación mecánica en endodoncia (113).

Sin embargo, el efecto del EDTA se encuentra condicionado por su concentración, que debe ser siempre menor al 17% y a su tiempo de exposición, encontrándose en un rango de 1-3 minutos para evitar el exceso de permeabilidad celular y, como resultado, su toxicidad (114).

Algunos estudios también tratan sobre la mejora de la adhesión tras el uso del EDTA o sobre cómo su aplicación favorece la diferenciación de células pulpares (115).

1.5 Efectos de las NPsAg en la biocompatibilidad

La biocompatibilidad fue definida como “la capacidad de un material para actuar con una respuesta adecuada del huésped en una aplicación específica”. A esta conclusión llegó la comunidad científica en un consenso a finales de los años 80 (116). Esto significa que dependerá específicamente de la aplicación a la que se destine el biomaterial que será considerado biocompatible o no. Se acepta, por lo tanto, que un material no es esencialmente biocompatible, sino dependiente del huésped (8).

Asimismo, recientemente el Dr. David Williams la define de la siguiente manera: “la biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un material para desempeñar la función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar efectos locales o sistémicos

indeseables en el receptor o beneficiario de dicha terapia, sino generando una respuesta celular o tisular beneficiosa más adecuada en esa situación específica y optimizando el rendimiento clínicamente relevante de dicha terapia” (117).

En la aplicación de biomateriales, existen tres componentes formados por células, tejidos o reacción del sistema huésped que se divide en tres tipos de componentes: el componente diana, formado por células o tejidos donde se desea que se produzca el efecto del biomaterial; el componente defensivo, compuesto por la inmunidad innata, plaquetas o elementos celulares o no celulares del complemento; y el componente de interferencia, aquellas células o tejidos que interaccionan con el biomaterial mientras este llega a su objetivo. En este último cobra especial importancia la ruta que se elija para la aplicación del material por la interacción con órganos como el hígado o los riñones (118, 119).

La interacción del biomaterial con las células puede producirse mediante 3 vías: internalización (fagocitosis), química (forma o estructura química) y mecánica o biofísica (campos electromagnéticos o estrés de fluidos). De todas estas interacciones se pueden llegar a producir reacciones que desemboquen en necrosis, apoptosis o generación de especies reactivas de oxígeno que, aunque pueda parecer que son negativas, pueden beneficiarnos si el objetivo es, por ejemplo, un grupo de células cancerígenas (8).

Con el objetivo de evaluar estos parámetros de manera objetiva existen ensayos experimentales que evalúan la seguridad del uso de los materiales mediante su biocompatibilidad antes de que sean comercializados. En este sentido existen las normas ISO 10993 e ISO 7405 que establecen, a nivel internacional, unos criterios para evaluar la seguridad de los materiales dentales. Destaca en este aspecto la prueba de viabilidad celular (120).

El uso de las NPsAg ha sido estudiado hasta día de hoy en diferentes aspectos tanto de manera *in vitro* como *in vivo* para determinar cuáles pueden ser sus complicaciones farmacocinéticas, absorción sistémica, distribución, metabolismo y excreción. La importancia de esto radica en que desde el momento en que las NPsAg entran en el

organismo, las interacciones producidas originarán cambios en las características fisicoquímicas de éstas (121).

El diseño y ensamblaje de las NPsAg (superficie o distribución) afecta a la interacción con las células en su adhesión, proliferación y migración, incluso en su diferenciación, afectando de esta manera a su biocompatibilidad y eficacia (122). Actualmente se conoce que aquellos compuestos insolubles son menos tóxicos que los compuestos solubles (123).

1.6 NPsAg como antiséptico dentinario

Las NPsAg han sido utilizadas como antiséptico dentinario, en estudios donde se compararon con otros antisépticos como el digluconato de clorhexidina o las NPs de sílice. En ellos concluyeron una mayor efectividad antibacteriana frente a las NPs de sílice y titanio, así como mejores resultados que con el digluconato de clorhexidina (124).

Por otro lado, aunque las NPsAg son más capaces de disolver el biofilm bacteriano que la clorhexidina al 2 %, es el hipoclorito de sodio (NaCl) el que mejores resultados muestra, tanto en disolución de biofilm, como en eliminación de bacterias, cuando se utiliza como irrigante intracanal frente a *Enterococcus faecalis* (48).

En los ensayos con células, un reciente estudio pudo probar como la clorhexidina al 2 % mostraba el mayor número de células necróticas/apoptóticas frente a los grupos de NPsAg y ácido hipocloroso. Sería este último el que mostraría un menor ratio de células muertas, aunque su capacidad antibacteriana sería inferior a las NPsAg y NaCl, que muestran un mayor poder desinfectante. Se concluye de este artículo que las NPsAg serían aquellas que muestran mayor porcentaje antibacteriano con una tolerancia superior por parte de las células, a excepción del ácido hipocloroso (125).

Estudios sobre el método de aplicación de NPsAg comprobaron que su uso como medicación intracanal lo hace más efectivo que su uso como irrigante (126); así como su

uso en gel igualaba la eficacia de la solución o enjuague de clorhexidina al 0,2 % (127). También se ha estudiado su uso en combinación con otros irrigantes, donde fue más efectivo que cuando era utilizado como irrigante único. No obstante, la mayoría de los trabajos relacionados con este tema son realizados in vitro y presentan mucha heterogeneidad en su metodología (128).

En relación con su uso junto a otros materiales, se han encontrado buenos resultados cuando se usaron con materiales como placas de titanio (129) o superficies nanotubuladas (130) influenciado por su afinidad por superficies electrostáticas y enlaces de Van der Waals. Cuando testaron su uso en adhesivos para ortodoncia y encontraron que la adición de NPsAg reduce la resistencia al cizallamiento, así como aumenta la rugosidad superficial y microdureza, estableciendo el porcentaje de concentración por debajo del 0.1% (131).

Finalmente, con relación a su interacción con las bacterias existen tres mecanismos principales por los que impiden la adhesión de éstas:

- Provocan cambios en las interacciones electrostáticas de las bacterias por la carga superficial que presentan (132).
- Disminuyen la expresión de genes que son responsables en la interacción de las bacterias con el medio (133).
- Dificultan la formación de biofilm por la ausencia de proteínas de la matriz como las adhesinas (134).

1.7 Justificación

En medicina desde la antigüedad, los buenos resultados del uso de la plata han justificado su investigación con el objetivo de conocer más en profundidad sus mecanismos de acción y posibles aplicaciones.

A través de la nanotecnología ha sido posible diseñar y sintetizar materiales de plata, entre los que se encuentran las NPsAg, que proporcionan distintas maneras de aplicación

y actuación de los materiales. Es por ello por lo que podemos encontrar las NPsAg con diversas cargas, recubrimientos, morfologías y tamaños. Estos materiales ofrecen alternativas para tratamientos que, por ejemplo, requieran acabar con células cancerosas de manera más específica o permitan regular la liberación del material para que se produzca de manera más gradual, reduciendo su toxicidad (19).

En odontología, su aplicación ha sido probada en distintos ámbitos como en la prótesis para refuerzo de materiales; la endodoncia como irrigante y sellador; en implantes como recubrimiento para evitar la colonización bacteriana; y en resinas compuestas por su efecto antibacteriano, entre otros usos (13).

Las investigaciones más recientes sobre NPsAg se focalizan en sus características morfológicas e interacciones con el medio, de manera que se explique más exactamente su funcionamiento (42). Su uso en biomateriales supone una interacción con células, entre ellas las células madre pulpares. Conocer la respuesta de estas frente al tratamiento y sus distintas dosis permitirá adecuar y perfeccionar los materiales dentales, para conseguir el efecto bactericida deseado sin provocar efectos negativos con daños celulares que interfieran en su viabilidad.

2. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Conocer la citotoxicidad que presentan dos tipos de nanopartículas de plata, MG-89 y MG-85, frente a células de la pulpa dental para poder establecer dosis seguras de uso de estos materiales como desinfectante de cavidades dentinarias.

Objetivos específicos:

- Conocer la concentración de NPsAg de cada muestra que reduce el metabolismo celular y crecimiento de las células madre pulpares al 50%.
- Determinar la viabilidad de las células madre pulpares tras su tratamiento con MG-89 y MG-85.
- Analizar la respuesta de migración celular ante una herida provocada tras la aplicación del tratamiento con los dos tipos de NPsAg.
- Utilizar la inmunofluorescencia para el análisis de imágenes obtenidas tras el contacto con ambos materiales y así conocer forma, adhesión y desarrollo de las células madre pulpares.
- Estudiar la producción de especies reactivas de oxígeno en las células tras la exposición a MG-89 y MG-85.
- Analizar la respuesta inmune frente al tratamiento con MG-89 y MG-85 por medio del estudio de marcadores inflamatorios como son las interleucinas.
- Utilizar la citometría de flujo para el análisis de la afectación del ciclo celular al tratamiento con las NPsAg.
- Establecer un rango seguro de trabajo que ofrezca baja toxicidad con dos NPsAg de diferente tamaño para su uso en células vivas.

3. MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio fue previamente aprobado tanto por el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Murcia (ANEXO 1), como por el Comité Ético (ANEXO 2). Los participantes que donaron sus muestras biológicas fueron informados y firmaron el consentimiento informado (ANEXO 3) con el objetivo de participar en este proyecto de investigación en el que se asegura el anonimato de las muestras una vez procesadas.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Normativa Internacional de Estandarización (ISO 10993:2009) (135), que tratan sobre la biocompatibilidad de los productos sanitarios que se usan en odontología, para la preparación de las muestras y materiales de referencia (ISO 10993-12:2009) (136) y de ensayos de citotoxicidad *in vitro* (ISO 10993-5:2009) (137).

Para la realización de estos experimentos se utilizaron dos tipos de nanopartículas de plata con una capa de polietilenimina dispersados en agua de diferentes tamaños, MG-85 (ANEXO 4) y MG-89 (ANEXO 5). Las NPsAg se encuentran recubiertas de polietilenimina (PEI) y se estabilizaron con polivinilpirrolidona (PVP) dispersas en agua MiliQ. La polietilenimina, compuesta por grupos amino, es un polímero orgánico que aporta carga positiva a las NPsAg.

Las NPsAg se diferencian en su tamaño y morfología: MG-89 es más pequeña y presenta una morfología regular que favorece su dispersión; y MG-85 es de mayor tamaño, forma no homogénea y con aglomeraciones.

Para su fabricación se utilizó un procedimiento químico propuesto por Sharonova y cols. (138) denominado *wet-chemistry* y fueron cedidas por el fabricante NanoGap® que forma parte del grupo de investigación Nanomag de la Universidad de Santiago de Compostela. En la tabla 1 se representan sus características.

Tabla 1: Especificaciones de las nanopartículas usadas en este estudio.

	MG-85	MG-89
Color	Marrón caramelo	Marrón caramelo
Contenido total sólido	112,7 g/L (Ag@PEI)	99,3 g/L (Ag@PEI)
Contenido total de plata en la muestra	26,20 g/L (Ag)	16 g/L (Ag)
Contenido total de PEI en la muestra	86,50 g/L (PEI)	83,3 g/L (PEI)
Tamaño medio determinado por microscopio de transmisión de electrones(nm)	18,83±8,86	3,67±1,06
Morfología	Quasi-esférica	Esférica

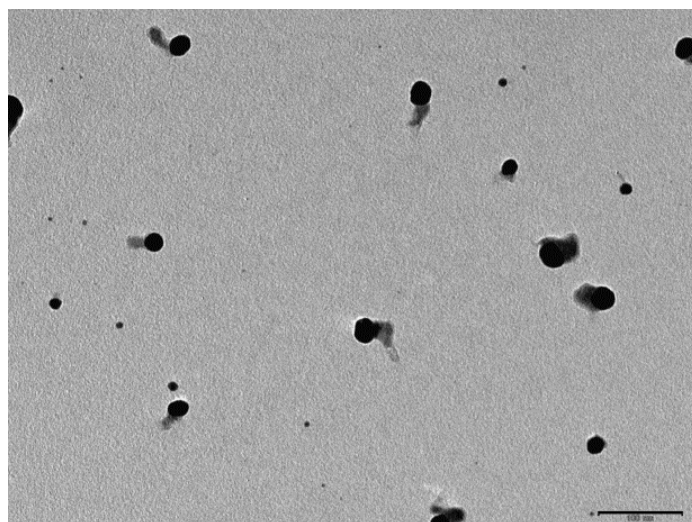


Figura 3. MG-85 bajo microscopio de transmisión de electrones.

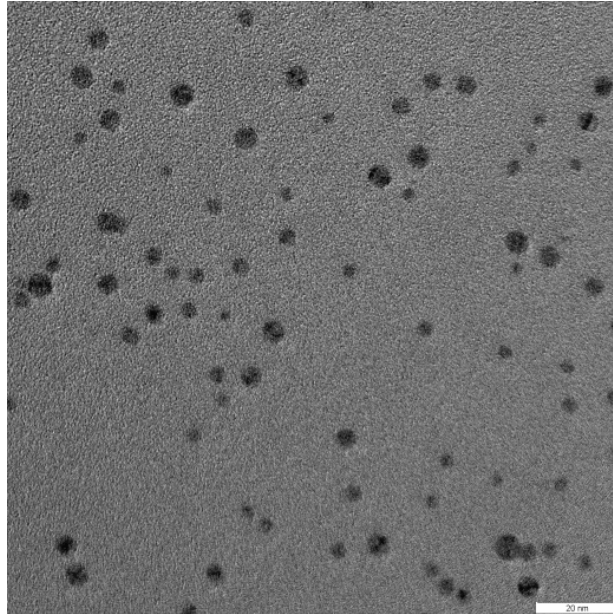


Figura 4. MG-89 bajo microscopio de transmisión de electrones.

3.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se encuentra conformada por células pulpaes provenientes de dientes permanentes sin patología pulpar, en ausencia de enfermedad y que hubiesen sido exodonciados por motivos ortodónticos como premolares o terceros molares. No se incluyen, por tanto, dientes temporales, dientes cariados o con patología pulpar (tipo necrosis por alguna otra circunstancia), ni aquellos que presentaban quistes de cualquier origen.

El tamaño muestral se estableció, por tanto, en $n=3$ y fue conformado por células madre aisladas de la pulpa dental de dientes permanentes.

3.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR

Tras la exodoncia de los dientes seleccionados, se procedió al tratamiento de estos para la obtención de las células. No se identificaron las muestra para asegurar el anonimato de los donantes.

Una vez recolectados, fueron introducidos en tubos FALCON de 50 ml que contenían la siguiente solución:

- Medio de cultivo DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) de alto contenido en glucosa (Biowest, Nuaillé, Francia).
- Solución de antibióticos y antifúngico (HyClone, Utah, EE. UU.):
 - o 10 unidades/ml de penicilina G.
 - o 10 unidades/ml de estreptomicina
 - o Anfotericina B 0.25µg/ml como antifúngico
- Suero bovino fetal: 10 % (Cytiva, Utah, EE. UU.)

El tiempo máximo de almacenamiento de los dientes fue de 48 horas a una temperatura de entre 4°C y 8°C.

3.2.1 Extracción de pulpa dental

El procedimiento de extracción de pulpa dental se realizó en una cabina de seguridad biológica de tipo II con filtro HEPA (Telstar) para poder garantizar las condiciones de esterilidad. Los investigadores aseguraron su protección mediante la utilización de guantes, gafas protectoras, bata de laboratorio y mascarillas. La cabina fue desinfectada con etanol al 70 % previo a su uso, así como aquellos elementos que se introdujeron en ella (tubos de Eppendorf, pipetas, gradilla, etc.).



Figura 5. Cabina Telstar Bio II A.

Tras seccionar los dientes de manera transversal se extrajo la pulpa mediante el uso de limas K-flexofile de calibre #10 y #15 y tiranervios (Maillefer Dentsply, EE. UU.). Una vez aislada y rehidratada con PBS se realizó la disgregación enzimática añadiendo a un tubo FALCON:

- Tampón HBSS: 1 ml (Gibco)
- Colagenasa tipo I 2x (200 U/mL): 1ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)
- Dispasa 100mgr/ml: 80 µl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.)

3.2.2 Disgregación enzimática

Con el objetivo de aislar células, se introdujo la pulpa en el preparado enzimático anteriormente mencionado.

Los tubos se incubaron en un baño de agua (Ovan, Barcelona, España) a 37° C y se agitaron cada 1-2 minutos con el objetivo de optimizar el proceso.

Durante el proceso se obtuvieron algunos fragmentos de mayor tamaño de tejido pulpar, por lo que se sustituyeron 500 µl de la suspensión celular por la misma cantidad de la preparación enzimática y se continuó con la disgregación.

Los 500 µl extraídos se diluyeron en un nuevo tubo estéril con 500 µl de medio de cultivo frío para inactivar las enzimas y se centrifugaron para lavar las células aisladas.

El medio de cultivo utilizado contenía:

- DMEM de alto contenido en glucosa (Biowest).
- Suero bovino fetal: 10 % (Cytiva).
- Glutamina 1 %: glutamina 200 mM en 0.85 % de solución de cloruro de sodio (Lonza, Verviers, Bélgica)

- Antibióticos y antifúngico al 1%: 10 000 unidades/ml de penicilina G; 10000 unidades/ml de streptomycin; 25µg/ml de anfotericina B) (Hyclone).

La centrífuga (Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) se programó a 300G durante 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se añadió 5 ml de medio del cultivo celular DMEM ya descrito en la cabina Telstar BIO II. El proceso se repitió hasta disgregar todo el tejido pulpar.



Figura 6. Centrífuga Heraeus, Thermo Fisher Scientific.

Finalmente, para la obtención de colonias de células a partir del tejido pulpar disgregado, se utilizó el pellet generado en la centrífuga. Este fue introducido en un frasco de cultivo de 25 cm² con 4.5 ml medio de cultivo 500 µl de suspensión celular. Posteriormente se incubaron en una estufa de cultivo (Estufa de cultivo Series 8000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) a 37°C, con una concentración de 8.5 % de CO₂ durante 5 o 6 días.

Una vez obtenidas colonias celulares, se realizaron cambios de medio de cultivo cada dos días para mantener a las células correctamente nutridas y libres de desechos hasta que se pudo alcanzar una confluencia del 80 % en los frascos de cultivo.

3.3 TRIPSINIZACIÓN

La preparación de la suspensión celular utilizada en los siguientes experimentos se realizó mediante el proceso de tripsinización a partir del cultivo en frascos. La tripsina es una enzima proteasa que permite despegar las células del frasco en el que se encuentran, ya que actúa rompiendo los enlaces formados por proteínas (fibronectina, laminina, etc.). Para ello, se combina con EDTA, ya que facilita el secuestro de iones calcio y magnesio, necesarios para la adhesión celular.

Los pasos seguidos fueron, por tanto, los siguientes:

- Retirada de medio de cultivo, de manera muy cuidadosa para evitar dañar las células que se encuentran en el fondo del frasco.
- Añadir 10 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato) (Gibco), para eliminar restos de medios, residuos y facilitar la acción de la tripsina.
- Agregar la solución Trypsin-EDTA 0.25 % (Sigma Aldrich, St Louis, EE. UU.)
La cantidad a añadir es dependiente del tamaño del frasco utilizado. En este caso 2 ml al frasco de 25 cm².
- A continuación, se incubó el frasco en la estufa a 37° durante 5 minutos. Tras este tiempo se colocó el frasco bajo el microscopio, previamente se sacudió ligeramente para ayudar de manera mecánica a despegar las células que pudieran quedar adheridas.
- En el microscopio de fases invertido (Motic AE30 Series, Vancouver, Canadá) se observó la muestra para comprobar que se encontraban en suspensión.
- Para la inactivación total de la tripsina se añadió medio de cultivo DMEM completo al doble de cantidad que de tripsina, la cual no debe estar más de 5 minutos en contacto con las células, porque afectaría a las proteínas de la membrana. En este caso se añadieron 2 ml de tripsina, se utilizaron 4 ml de DMEM.

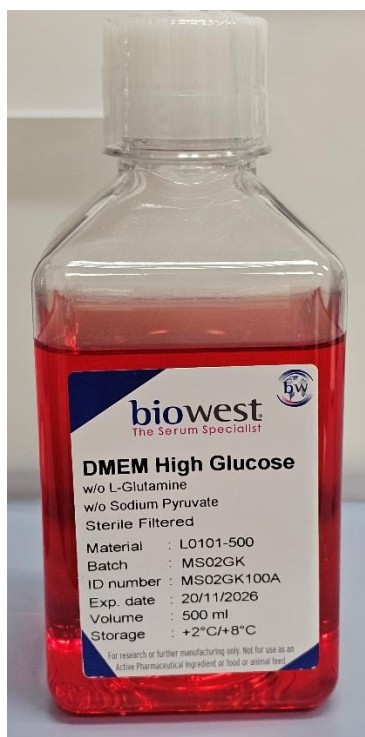


Figura 7. DMEM alto en glucosa (Biowest)

- Finalmente se introdujo la suspensión en tubos Falcon y se centrifugó a 300 G durante 5 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, el pellet que contenía las células se resuspendió con 5 ml de DMEM completo.

3.4 CARACTERIZACIÓN

La caracterización celular se llevó a cabo mediante un análisis de citometría de flujo donde se evaluó el perfil inmunofenotípico de las células madre de pulpa dental. Se suspendieron 1×10^5 células en 100 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con 1 % de FBS. Para confirmar su fenotipo mesenquimal, las células se marcaron con un panel de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (CD14, CD20, CD34, CD45, CD73, CD90 y CD105; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Posteriormente, la expresión de estos marcadores se evaluó mediante citometría de flujo, en concordancia con lo establecido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISTC)(139).

3.5 RECUENTO CELULAR

La realización del recuento celular se llevó a cabo para conocer la población celular y su viabilidad. Para la lectura es necesario utilizar la tinción de azul tripán, colorante que es usado para distinguir las células vivas de aquellas muertas de la siguiente manera:

- Las células vivas expulsan activamente el colorante por su membrana celular que se encuentra intacta y se muestran, por tanto, al microscopio se observan transparentes y con un halo azul al su alrededor.
- Las células con membranas afectadas o muertas se muestran permeables y por tanto se tiñen en su interior, viéndose de color azul.

El recuento se realizó mediante la utilización de un contador automático (TC20 Automated Cell Counter, BIO-RAD, California, EE. UU.).

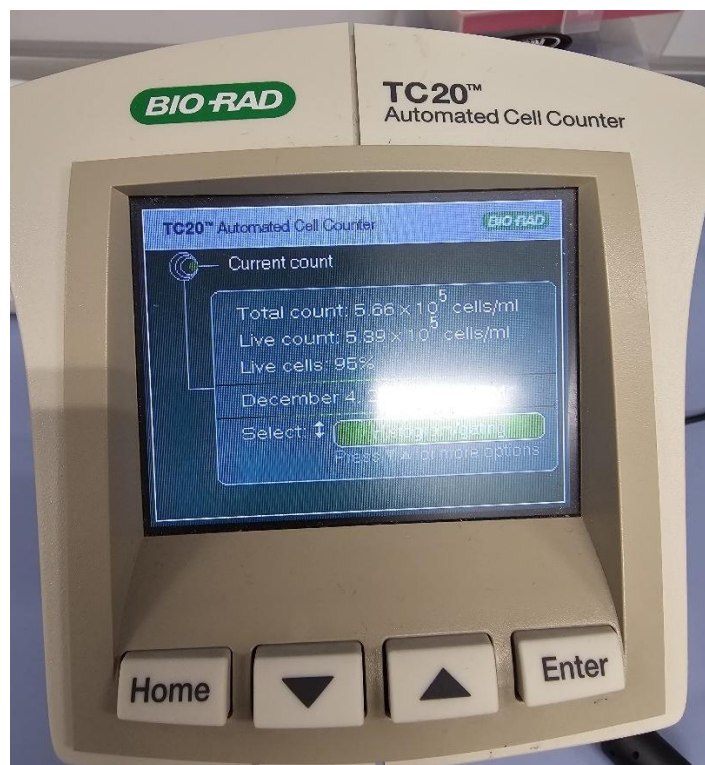


Figura 8. Contador con resultados de la muestra

La suspensión que se preparó contenía azul tripán y el medio con las células en proporción 1:1 (Sigma Aldrich, St Louis, EE. UU.) resuspendiendo cuidadosamente para asegurar bien la mezcla. Finalmente se colocó en la placa para introducir en la cámara de conteo y se realizó el conteo automático. El rango de tamaño celular que se obtuvo

fue de 4 a 34 μm , siendo expresados los datos de células totales y viables por el contador en “cel/ml”.

3.6 ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Con el objetivo de evaluar la biocompatibilidad de los dos tamaños del material de estudio, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

- Análisis de concentración de inhibición media
- Análisis de actividad metabólica
- Ensayo de la migración celular
- Ensayo de inmunofluorescencia
- Anexina -V-FITC y 7-AAD para el análisis de necrosis y apoptosis celular
- ROS intracelular
- Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Con ellos obtuvimos datos para la interpretación de dosis medias de tratamiento, afectación a la morfología y replicación celular o producción de sustancias inflamatorias, entre otros.

3.6.1 Análisis de la concentración de inhibición media

El análisis de la concentración de inhibición media consiste en estudiar los datos obtenidos de la colorimetría del MTT para conocer cuál es la concentración del tratamiento donde las células ven reducido su metabolismo celular y crecimiento al 50 %.

El ensayo MTT es un experimento en el que se utiliza la sal de tetrazolio 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro para conocer la viabilidad celular, la actividad metabólica y citotoxicidad.

Para ello se toma como referencia la IC_{50} (concentración inhibitoria media) que es una medida cuantitativa de la toxicidad o biocompatibilidad del fármaco de estudio. A partir

de la realización de este experimento obtuvimos las concentraciones que nos permitieron trabajar en rangos seguros de viabilidad celular para los siguientes ensayos.

El primer paso para la realización del experimento consistió en una siembra de células pulpaes mesenquimales llevada a cabo de la siguiente manera:

- Se prepararon dos placas de 96 pocillos donde se sembraron 1500-3000 células por pocillo con volumen de 180 µl de medio DMEM por pocillo.
- Con el objetivo de permitir la adhesión de las células al fondo se incubaron en una estufa a 37 °C y una concentración de CO₂ de 8.5 % durante 24 h.
- Para la aplicación del tratamiento con NPsAg se obtuvieron las siguientes diluciones de los dos materiales a estudiar (MG-89 y MG-85): 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,15 µg/ml, 1,5 µg/ml y 0,75 µg/ml.
- La aplicación del tratamiento se realizó en la cabina Telstar BIO II A, donde se retiraron 180 µl de medio de los pocillos con el cultivo celular con una pipeta multicanal y se añadieron 120 µl de las correspondientes diluciones con el tratamiento. También se incluyó una fila de pocillos sin tratamiento que sirviese como control en cada una de las placas.
- Los pocillos con el tratamiento aplicado fueron incubados durante 24 h en la estufa a 37 °C.

A las células ya expuestas a las diluciones de MG-89 y MG-85 se le añade el MTT. Las células vivas lo metabolizan obteniendo como producto final formazán insoluble. El formazán se solubiliza con DMSO y puede ser medido colorimétricamente (140). La enzima succinato deshidrogenasa es la responsable de reducir este compuesto insoluble que cambia de su color amarillo inicial a morado cuando es metabolizado.

La colorimetría de este experimento se basa en la absorbancia del formazán cuando se solubiliza en dimetilsulfóxido (DMSO) y se cuantifica en un espectofotómetro 200 PRO (Tecan, Grödig, Austria). El resultado de absorbancia es proporcional al número de células viables.

Para llevar a cabo la aplicación del MTT a las placas con el tratamiento se siguieron los siguientes pasos:

- Se preparó una dilución de MTT (Sigma Aldrich) en polvo con DMEM sin rojo fenol para que no interfiriese en la lectura de colorimetría, a una concentración de 5 mg/ml, la solución fue filtrada, cubierta con papel de aluminio y almacenada a una temperatura de 4°C.
- Para la aplicación del MTT se prepararon las placas de la siguiente manera:
 - Retirada del medio de cultivo, quedando únicamente el pocillo con las células adheridas.
 - Lavado de pocillos con PBS atemperado.
 - Adición de 200µl de medio de cultivo DMEM sin rojo fenol y sin suero (Thermo Fisher, Paisley, Reino Unido).
 - Adición de 50µl del preparado de Stock de MTT (5mg/ml), obteniendo una concentración final de 1mg/ml.
 - Se cubrió con papel de aluminio para, de nuevo, no verse afectado por la luz ambiental, y se incubó de 2 a 4 h en la estufa a 37°C. Dejaremos espacio con el papel de aluminio en los laterales para que se produzca el intercambio gaseoso.
- Tras la incubación de 24 h, retiramos el sobrenadante y añadimos 100µl de DMSO (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polonia) por pocillo para solubilizar los cristales de formazán.
- En el espectrofotómetro INFINITE 200 PRO (Tecan, Grödig, Austria) se introdujeron las placas y se midió la absorbancia a 570 nm y 690 nm.
- Finalmente se analizaron los datos obtenidos calculando la media y desviación estándar del control y los tratamientos.

A partir de los datos obtenidos, se seleccionaron en la gráfica generada con la media y la desviación estándar, aquella concentración que marcaba el 50 % del metabolismo celular mostrado. Obteniendo así dos resultados en forma de gráfica.

Este experimento muestra la sensibilidad celular al tratamiento, por lo que un IC₅₀ bajo estaría mostrando bajas dosis de tolerancia o alta toxicidad, mientras que un IC₅₀ elevado

sería signo de alta biocompatibilidad y tolerancia. Con él pudimos calcular dosis subtóxicas, aquellas por debajo del dato obtenido.

Estos resultados se expresaron con una gráfica de curva sigmoidea donde el eje X mostró la concentración y el eje Y el porcentaje de viabilidad celular, siendo 100 % ausencia de inhibición y 0 % la muerte total de las células.

Los resultados del ensayo IC_{50} permitieron determinar si las dosis seleccionadas para el experimento proporcionaban respuestas celulares viables y así poder realizar este y los siguientes ensayos.

3.6.2 Análisis actividad metabólica

El ensayo de actividad metabólica es un experimento basado en la colorimetría para determinar la proliferación celular, viabilidad y citotoxicidad de los materiales de estudio. Su realización consiste en exponer a las células pulpaes mesenquimales al tratamiento con MG-89 y MG-85 durante 24, 48 y 72 h, de manera que permita el análisis de sus efectos en diferentes tiempos.

Para su realización se prepararon 3 placas por tratamiento con una densidad celular de 3000 células por pocillo. A continuación, se aplicó a los pocillos las diluciones de 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ con el tratamiento de MG-89 y MG-85. En esta ocasión los tiempos de incubación de las placas tratadas fueron: 24, 48 y 72 horas. Seguidamente se procedió a la aplicación del MTT para el análisis colorimétrico usando la metodología descrita en el apartado anterior.

3.6.3 Ensayo de la migración celular

El ensayo de migración celular consiste en estudiar la capacidad de las células para desplazarse y ocupar un espacio en un placa a lo largo de un tiempo determinado tras haber aplicado un tratamiento y provocado una herida en ella.

El experimento se lleva a cabo tras la siembra de una placa de 12 pocillos con 200.000 cel./pocillo en 2 ml de DMEM completo. Con el objetivo de favorecer el crecimiento y la adhesión celular, se incubaron las placas en la estufa a 37 °C durante 24 horas.

Una vez obtenidas las diferentes diluciones para la aplicación de las NPsAg, se llevan a cabo los siguientes pasos:

- Se realiza una herida a modo de cruz en el centro del pocillo con un punta estéril de micropipeta, para no contaminar el medio.
- Se retira el medio de cultivo.
- Los pocillos se lavan con PBS estéril.
- En el control se vuelve a añadir 2 ml de medio DMEM completo y en el resto 2 ml de la dilución correspondiente de cada nanopartícula: 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml y 1 µg/ml.
- Se introducen de nuevo en la estufa y se observa la evolución de la herida al microscopio de contraste de fases invertido (Nikon Eclipse Ti-S, Japón), del que se obtuvieron imágenes (Nikon Digital Sight, Japón) a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h.
- Con el fin de obtener datos cuantitativos que expresen más objetivamente los resultados, se analizaron las imágenes obtenidas mediante el programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) en el que se cuantifica de forma relativa el área sin cerrar de la herida.

3.6.4 Ensayo de la inmunofluorescencia

El ensayo de inmunofluorescencia consiste en detectar proteínas específicas a través de anticuerpos u otros compuestos con afinidad marcados con colorantes fluorescentes, en nuestro caso proteínas estructurales del citoesqueleto y el núcleo. El objetivo principal es conocer la morfología de las células tras haber sido sometidas a las NPsAg de estudio, evaluando la forma y consistencia de los núcleos celulares y la distribución de los filamentos de actina del citoesqueleto.

Para llevarlo a cabo se sembraron placas de 24 pocillos con un recuento aproximado de 20.000 cel./pocillo en un volumen de 500 µl/pocillo, permitiendo la adhesión de las células en la estufa a 37 °C durante 24 h para posteriormente aplicar las NPsAg de la siguiente manera:

- Preparación de diluciones con nanopartículas MG-89 y MG-85 y que resultarán en concentraciones de: 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml y 1 µg/ml.
- Retirada del medio de cultivo de los pocillos y aplicación de las NPsAg. En el caso del control solo se añadirá 500 µl de medio DMEM completo.
- Incubación durante en la estufa a 37 °C durante 72 h.
- Retirada del medio de cultivo y lavado en tres ocasiones con PBS (Gibco) de los pocillos.
- Preparación de paraformaldehído (PFA) al 4 % para la fijación de las células. Para ello añadimos 4 g de PFA en 100 ml de PBS (Gibco) y calentamos a 60°C, para posteriormente atemperar a 37°C. Añadimos el PFA a los pocillos para fijar las células adheridas al fondo y dejamos incubar durante 15-20 minutos.
- Lavado de los pocillos en tres ocasiones con PBS para eliminar los restos de PFA.
- Seguidamente, para crear poros en la membrana usamos Triton X-100 (Sigma Aldrich, St Louis, EE. UU.) al 0,25 %. Para ello añadimos la dilución a los pocillos y dejamos actuar durante 5-15 minutos para terminar lavando de nuevo con PBS en tres ocasiones.

Una vez hemos fijado células y núcleos, se usó la faloidina (Life Technologies, Willow Creek Road, Oregon, EE. UU.) en una dilución de 1:300 (20 µl en 5,98 ml de PBS). Esta toxina fotosensible presenta alta afinidad por la actina filamentosa (F-Actina) a la que estabiliza y evita su despolimerización. Se utiliza en combinación con el marcador celular fotosensible 4,6-diclorhidrato de diamino-2-fenilindol (DAPI) (Life Technologies, Willow Creek Road, Oregon, EE. UU) en una dilución con PBS 1:500, por lo que se utilizaron 20 µl en 10 ml de PBS. Se llevó a cabo de la siguiente manera:

- De la tinción de faloidina se añadieron 300 µl por pocillo en condiciones de oscuridad.

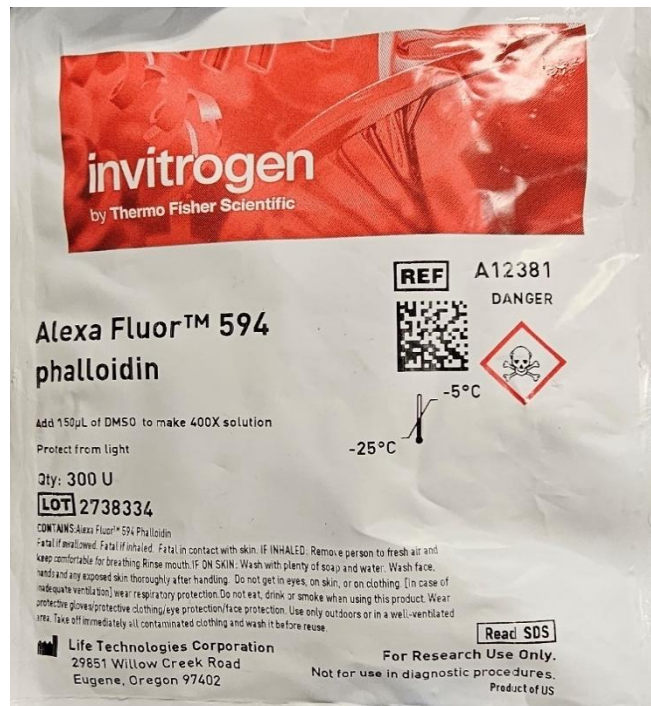


Figura 9. Faloidina, (Life Technologies, Willow Creek Road, Oregon, EE. UU.)

- Se incorporó la placa al agitador orbital (Elmi, Riga, Letonia), una vez cubierto para evitar contaminación lumínica, y se dejó actuar a una velocidad de 36 rpm durante 30 minutos a dos horas.
- Se retiró la faloidina y se lavó 3 veces con PBS.
- Se añadieron 400 µl de DAPI por pocillo y se dejó actuar durante 1-5 minutos. Para finalizar se vuelve a lavar con PBS en tres ocasiones.

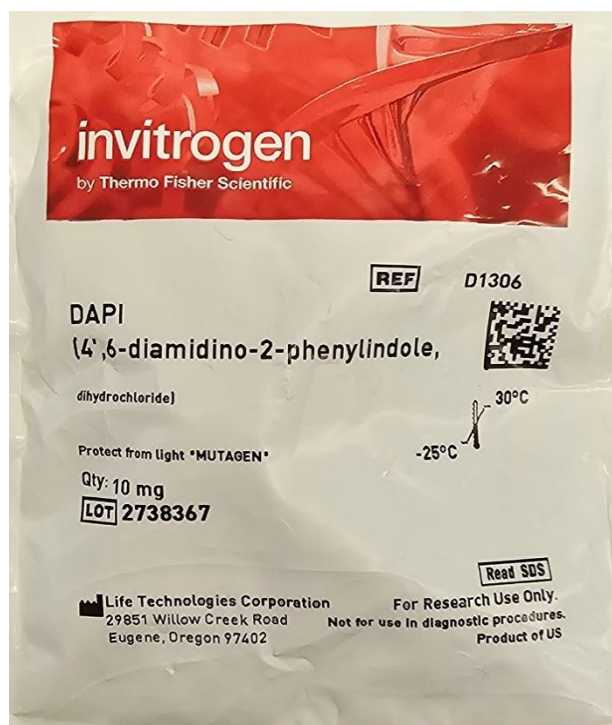


Figura 10. DAPI (4,6-diclorhidrato de diamino-2-fenilindol)

- Se protegió la placa y se transportó al microscopio de contraste de fases con fluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania). Para llevar a cabo la observación de la muestra se utilizaron x100 aumentos y se observaron los filamentos que teñidos en color rojo con una exposición 800-1000 ms y 2 de ganancia. Sin mover el foco, se cambió la longitud de onda para obtener la fluorescencia azul que nos indicó la presencia de los núcleos celulares; finalmente, se superpusieron las imágenes para obtener una imagen completa del núcleo y el citoesqueleto.

3.6.5 Ensayo de medición de las especies reactivas de oxígeno intracelular

Este ensayo se utilizó para determinar si la aplicación de NPsAg a las células madre mesenquimales pulpaes provoca la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) compuestas por radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anión superóxido (O_2^-) y peróxido de

hidrógeno (H_2O_2). La medición de estos compuestos proporciona información sobre el estrés oxidativo que producen el tratamiento aplicado a nivel celular ya que estos pueden provocar daños a nivel de ADN, proteínas o lípidos comprometiendo la viabilidad de las células (141).

El experimento de ROS (Especies Reactivas del Oxígeno, en inglés, *Reactive Oxygen Species*) se llevó a cabo de la siguiente manera:

En primer lugar, se realizó un cultivo de células en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia de un 80 % aproximadamente.

- A continuación, se aplicaron las NPsAg, MG-89 y MG-85, en las concentraciones: 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$, respetando en ambos casos una fila de pocillos de control sin NPsAg.
- Seguidamente se utilizó el reactivo TryPLE Express (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) para despegar las células de los pocillos. La metodología es la misma que para la tripsinización.
- Se realizaron dos lavados con PBS de los pocillos.
- En la cuantificación de niveles intracelulares de ROS se utilizó el compuesto 5-(γ -6)-clorometil-2'-7'-diclorodihidrofluorosceína diacetato (CM-H2DCFDA) (Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.) diluido en DMSO. Para la aplicación se obtuvo una concentración de CM-H2DCFDA con PBS de 5 $\mu\text{mol/L}$ para teñir los pocillos en condiciones de oscuridad y se dejaron actuar durante 30 minutos incubados a 37 $^{\circ}\text{C}$.
- Finalmente, esas muestras fueron introducidas en el citómetro de flujo LSR Fortessa-X-20 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) utilizando 492 nm para excitación y 517 nm para emisión.
- La población celular fue analizada con el software FlowJo que proporciona algunos de los resultados expuestos en el experimento de citometría de flujo que se expone en el siguiente apartado.

3.6.6 Ensayo de apoptosis/necrosis

Con el objetivo de conocer qué porcentaje de células entraban en apoptosis (muerte celular programada) y cuáles en necrosis al ser expuestas a MG-89 y MG-85 en diferentes concentraciones, se llevó a cabo este experimento.

En este ensayo se utilizó la Anexina V-FITC, un marcador biológico que se une a la fosfatidilserina presente en células con apoptosis temprana observándose fluorescencia verde; en combinación con el 7-AAD (7-Aminoactinomoicina D), el cual penetra en aquellas células que presentan membrana dañada, es decir, se encuentran en necrosis o apoptosis tardía y que emite una señal de fluorescencia roja.

El experimento se llevó a cabo mediante la siembra de 6 pocillos con un volumen de 2ml y 100.000 células por pocillo en la que se aplicaron los tratamientos con nanopartículas. También se incluyeron dos pocillos en las placas como control con medio DMEM completo. Se incubaron los pocillos durante 72 h a 37 °C en la estufa.

A continuación, procedemos a despegar las células de los pocillos mediante el método de tripsinización previamente explicado, pero en esta ocasión no descartamos el sobrenadante. Aplicaremos entonces, la tinción celular de Anexina-V que contiene FITC y 7-AAD (Immunostep, Salamanca, España) el proceso de preparación incluye la mezcla de los marcadores de la manera indicada por los fabricantes y su aplicación durante 15 minutos en nuestros pocillos a temperatura ambiente.

Para su análisis se realizó la citometría de flujo, ensayo que consistió en introducir las muestras en un sistema de flujo que hace pasar las células una por una por un láser para registrar la luz dispersa generada. A partir de los datos obtenidos por los receptores del citómetro (BD Facts Canto™), se obtienen las gráficas resultantes mediante el software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, EE. UU.).

El análisis ofreció resultados que fueron representados de manera gráfica de la siguiente forma:

- Q1: células necróticas

- Q2: células apoptóticas tardías
- Q3: células apoptóticas tempranas
- Q4: células vivas

Los datos obtenidos se representaron en gráficas Dot-Plot (diagrama de puntos) en el que cada punto replicaba el estado de cada célula y donde se representaron dos parámetros de manera simultánea: el eje X representaba Anexina-V con FITC; mientras que el eje Y representaba el 7-AAD.

Con este experimento obtenemos información sobre la variabilidad intercelular de manera más representativa que con la media o desviación estándar, debido a que obtenemos una representación individual de cada una de las células.

3.6.7 Ensayo de ELISA

El término ELISA se refiere a las siglas del término inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” utilizado para cuantificar anticuerpos, hormonas, citoquinas o antígenos presentes en una muestra. Su funcionamiento se basa en la unión de un anticuerpo a un antígeno y este a otro anticuerpo conjugado con una enzima que producirá señales detectables y cuantificables.

Las interleucinas analizadas fueron la IL-6 y la IL-8. La primera es una citoquina que actúa como mensajera en el sistema inmune gracias a su acción proinflamatoria, especialmente en la fase aguda. Su papel es muy relevante en la fiebre o la hematopoyesis o en la diferenciación de linfocitos T y B, así como activación de macrófagos y producción de anticuerpos (142).

La IL-8, por otro lado, es una quimiocina proinflamatoria cuyo mecanismo de acción provoca la migración de neutrófilos hacia el foco inflamatorio, así como otros neutrófilos, basófilos y células T (142).

Ambas proteínas se miden en suero y para ello el experimento de elección es el ELISA tipo sándwich. A continuación, se describen los pasos que se llevaron a cabo para el experimento ELISA para la detección de citoquinas IL-6 utilizando el kit “Human IL-6 (Interleukin 6) ELISA Kit” (FineTest® Biotech 1942 Broadway Street, Suite 314C Boulder CO 80302 US):

- Para comenzar, se preparó una placa con 24 pocillos donde se sembraron las células mesenquimales de pulpa dental. Posteriormente se aplicó el tratamiento con MG-85 y MG-89 en las concentraciones previamente determinadas y siguiendo la metodología del resto de los protocolos. Seguidamente se incubaron las placas durante 72 h en una estufa a 37°C.
- Ayudados por la pipeta, se recogió el sobrenadante (medio de cultivo) obtenido de las placas con el tratamiento, se centrifugó para eliminar restos celulares, se diluyó en un tampón para el acondicionamiento de la muestra y se depositó en la placa que presentaba el anticuerpo de captura Anti-human IL-6 monoclonal (R&D Systems, Minnesota, EE. UU.). A continuación, se dejó incubar 2h a 37 °C. con el objetivo de que el antígeno se uniese al anticuerpo de captura que presente en los pocillos.
- Posteriormente se lavaron los pocillos en 2 ocasiones con tampón de lavado.
- A continuación, se preparó la adición del anticuerpo de detección policlonal biotinilado anti-IL-6 diluyen a 1:99 de éste en el tampón proporcionado por el kit. Se añadieron 100µl por pocillo y se dejó incubar para después lavar en 3 ocasiones con tampón de lavado.
- En el siguiente paso se añadió el conjugado Streptavidina-HRP preparado según instrucciones, añadiendo 100µl por pocillo, se dejó incubar en condiciones de oscuridad 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó 5 veces.
- Seguidamente, se añadió TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), un sustrato cromogénico que reacciona con la enzima HRP produciendo un color azul y más tarde se vería alterado cambiando a amarillo cuando se añadió la solución STOP. El TMB se dejó actuar 15 minutos antes de añadir la última solución.
- Adición de 100 µl por pocillo de ácido sulfúrico 1M (solución STOP) para detener la reacción. En este paso observamos como el color cambió a amarillo.

- Finalmente se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro INFINITE PRO a 450 nm y se obtuvieron datos que fueron analizados con GraphPad y de los que se extrajo una gráfica.

Para la realización del ELISA de IL-8, se siguieron los mismos pasos cambiando los anticuerpos de captura y de detección para la IL-8.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La realización del análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el software Graph-Pad Prism v8.10 (GraphPad Software) del que se obtuvieron medias y desviaciones estándar (DE) previa comprobación de los datos con el gráfico Q-Q.

Para la significancia estadística se utilizó la prueba de análisis de la varianza ANOVA, en ella se introdujeron los datos de manera que cada una de las concentraciones expresase sus datos de manera independiente y considerando que los valores significativos se expresarían como “*” para $p < 0.05$, “**” para $p < 0.01$ y “***” para $p < 0.001$ en las gráficas. Se consideró estadísticamente significativo el valor $p < 0.05$. La prueba post-hoc de Tukey fue realizada para el análisis comparativo de los datos.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización celular

Las células observadas presentaban un tamaño comprendido entre 4 y 34 μm . La morfología hallada de las células pulpaes mesenquimales fue alargada, en forma de huso, similar a la de fibroblastos. El análisis por citometría de flujo evidenció que las células fueron positivas para CD73, CD90 y CD105, marcadores específicos de las células madre mesenquimales (MSCs), y negativas para los marcadores de células madre hematopoyéticas, en concordancia con el inmunofenotipo característico de las MSCs.

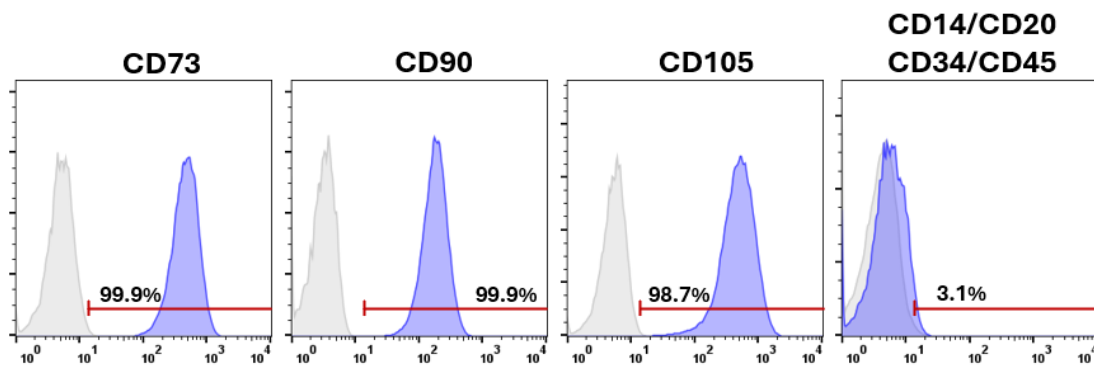


Figura 11. Fenotipo células madre de pulpa dental.

4.2. Análisis de la concentración de inhibición media

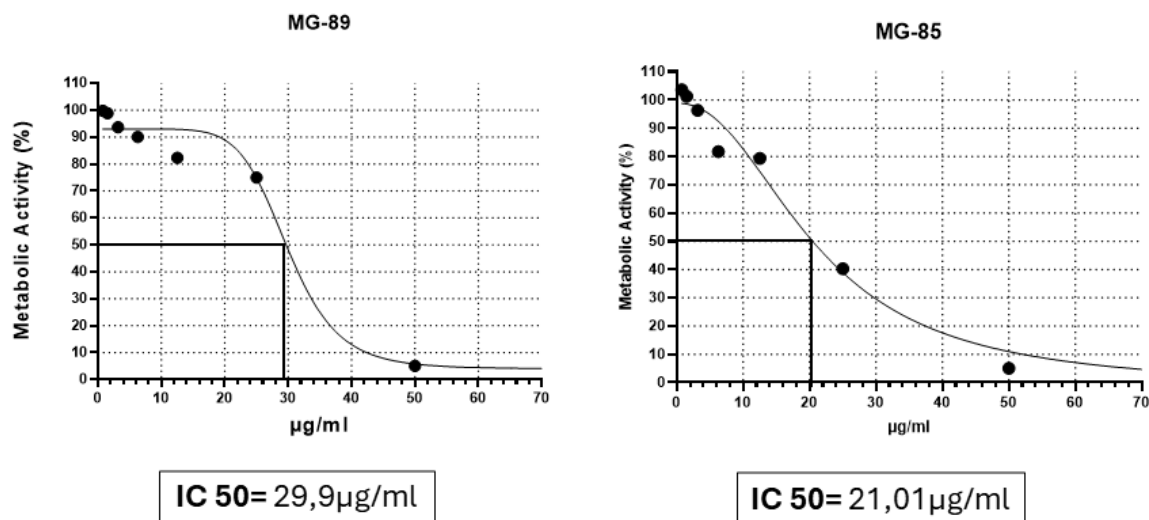


Figura 12. Representación gráfica de curva IC₅₀ para ambos materiales.

En el análisis de la concentración de inhibición media se realizó un análisis gráfico en el que se dibuja una curva sigmoidea que muestra que la dosis subcitotóxica para la MG-89 es de 29,9 µg/ml, mientras que para la MG-85 es de 21,01 µg/ml.

Existe, por tanto, mayor tolerancia en concentración a la muestra que contiene la MG-89, pudiendo utilizar dosis más altas de tratamiento hasta llegar a una en la que se pueda apreciar afectación celular.

4.2 Análisis de la actividad metabólica

El análisis de la actividad metabólica celular fue realizado con las siguientes concentraciones: 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml y 1 µg/ml a las 24, 48 y 72 h.

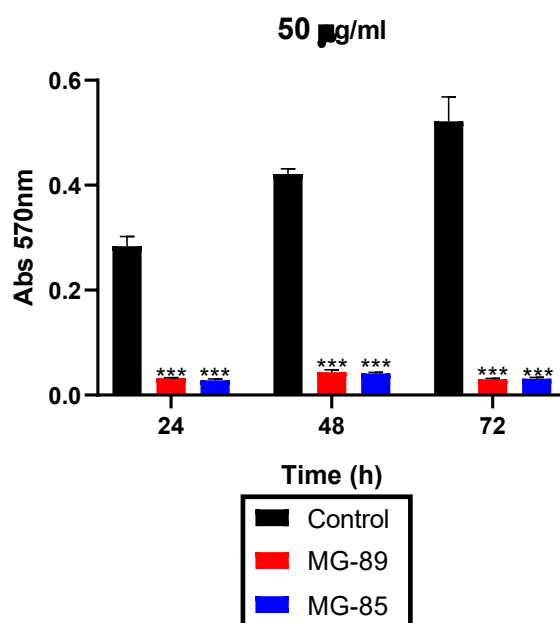


Figura 13. Proliferación celular con concentración de 50µg/ml

En la concentración de 50µg/ml se puede observar una gran afectación en la actividad metabólica celular en ambos tratamientos y en todos los tiempos analizados, mostrando diferencias muy significativas (***) ($p < 0.001$) en los dos tratamientos frente al control.

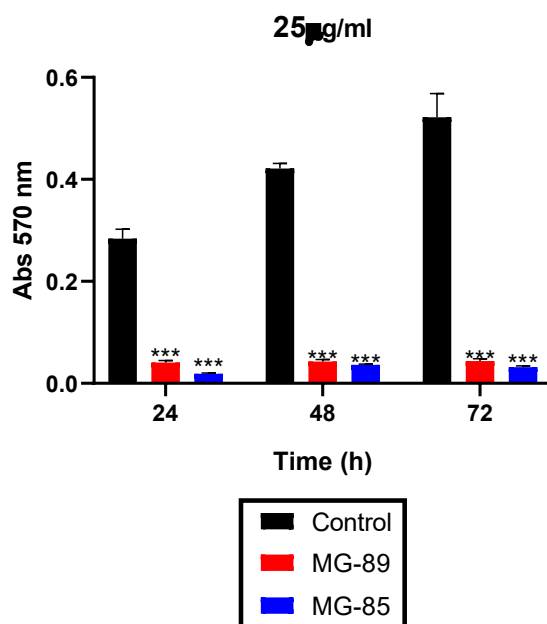


Figura 14. Proliferación celular con concentración de 25 µg/ml

De nuevo los dos tratamientos, MG-85 y MG-89, presentan tasas muy bajas de actividad metabólica desde las 24 h de tratamiento. El metabolismo celular se ve detenido con diferencias estadísticamente significativas y de manera muy evidente frente al control en ambos (**p<0.001).

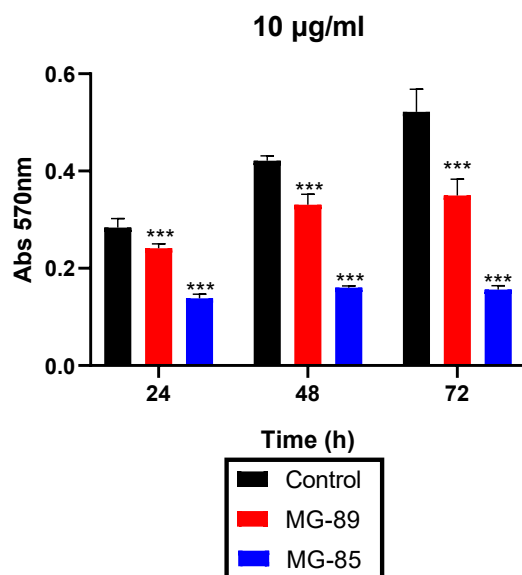


Figura 15. Concentración de 10 µg/ml para MTT

En esta ocasión, la concentración de 10 µg/ml permite un mayor desarrollo de la actividad metabólica. Sin embargo, sigue mostrando diferencias muy significativas frente

al control en ambas muestras ($***p<0.001$) estas diferencias se mantienen desde el inicio hasta el final de la aplicación del tratamiento.

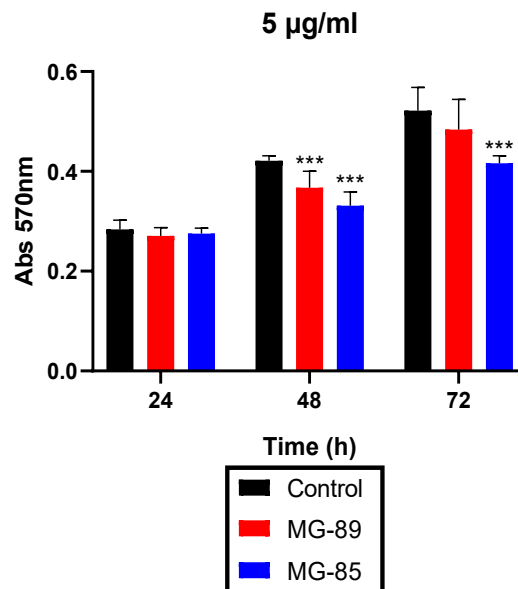


Figura 16. Concentración de 5 µg/ml para MTT

Para la concentración de 5 µg/ml vemos una mejora en la actividad metabólica celular, existiendo una diferencia entre la MG-89, afectando esta menos a la actividad metabólica; y la MG-85, la cual presenta a las 48h y 72h, diferencias estadísticas significativas ($***p<0.001$) con el control. Esta diferencia también se aprecia en la MG-89, únicamente las 48h.

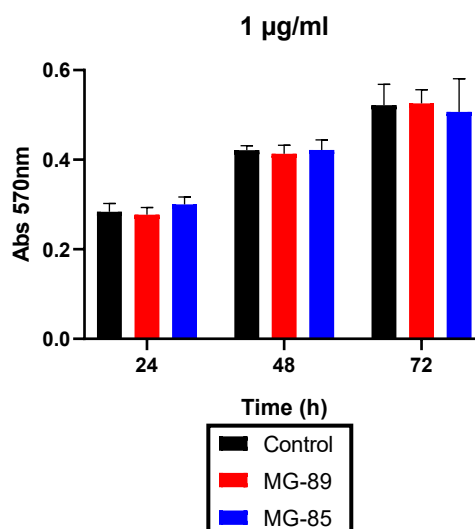


Figura 17. Proliferación celular con concentración de 1 µg/ml

Por último, para la concentración de 1µg/ml, encontramos una actividad celular similar a la del control y sin diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los periodos analizados.

4.3 Ensayo de la migración celular

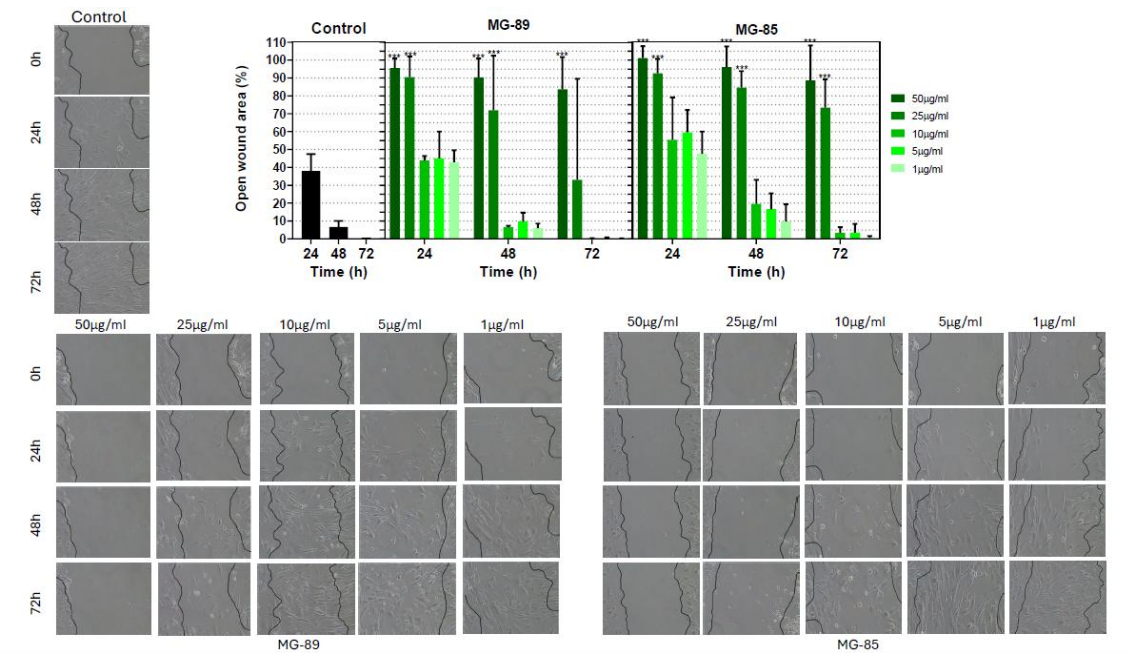


Figura 18. Representación del experimento de migración celular para MG-89 y MG-85 con gráfica descriptiva por porcentaje.

En este ensayo podemos apreciar la comparativa de la capacidad de colonización de una herida que presenta las células pulpares después de haber sido sometidas a los tratamientos con MG-89 y MG-85.

Los resultados nos muestran diferencias entre los dos tipos de tratamientos y a su vez entre las diferentes concentraciones.

Para la MG-85, tanto en la concentración de 50 µg/ml como en la de 25 µg/ml, no existe evidencia significativa de migración celular en las horas inmediatas a la inducción de la herida (0h). Podemos apreciar, además, una morfología indeseada sin aparente

crecimiento celular con el transcurso de las horas a 48 y 72h donde no existe avance, sino involución en el cierre de la herida.

Este patrón de la MG-85 mejora cuando la concentración es de 10µg/ml, observándose mayor presencia celular a las 72h; sin embargo, los resultados son de evidente mejora con las concentraciones de 5 µg/ml y 1 µg/ml, mostrando imágenes más similares al control.

En el caso de la MG-89, podemos observar un inicio de proliferación celular positivo en las imágenes a las 24h para las concentraciones de 50 µg/ml y 25 µg/ml, que se detiene a las 48h especialmente y llega a presentar, incluso, patrón de involución. Aunque este no es tan evidente como en su comparativa con la MG-85 a estas concentraciones.

Para la concentración de 10 µg/ml, el crecimiento celular es más similar al control. Sin embargo, se pueden observar restos de núcleos celulares redondeados en el fondo del pocillo muestra de crecimiento anormal.

Los mejores resultados los ofrece la concentración de 1 µg/ml donde el crecimiento es exponencial, con buena distribución y ausencia de depósitos celulares en el pocillo.

La gráfica nos muestra la diferencia porcentual de cierre de la herida entre los diferentes tratamientos. Muestra el cierre progresivo en los tratamientos con concentraciones más bajas. En las concentraciones altas (50 µg/ml y 25 µg/ml), existen diferencias estadísticamente muy significativas (**p<0.001) con respecto al control. Además, se muestra un cambio en el intervalo de confianza el cual podría verse afectado por los depósitos de núcleos celulares presentes en las imágenes.

4.4 Ensayo de inmunofluorescencia

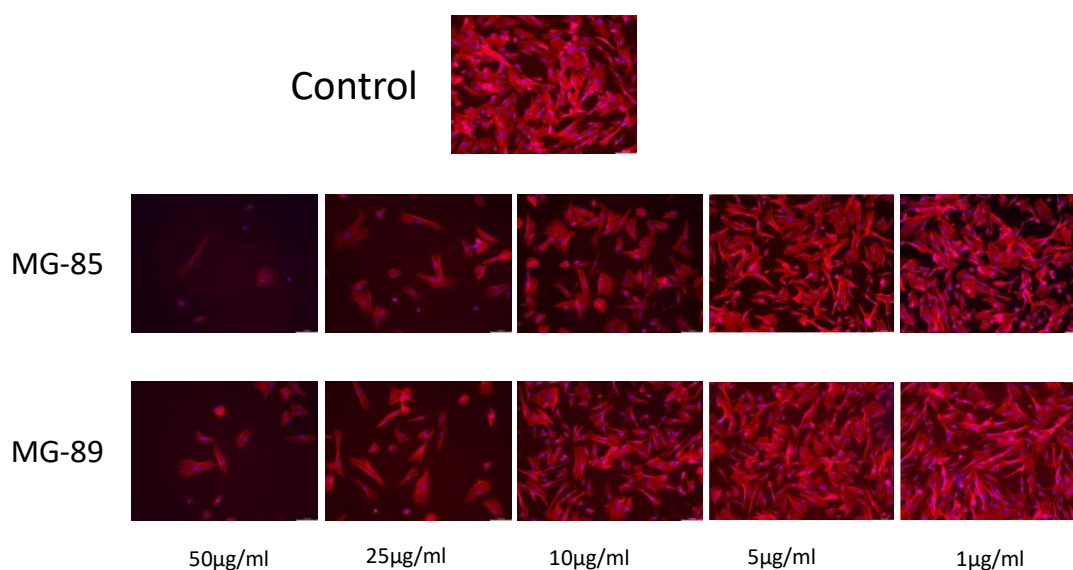


Figura 19. Fluorescencia de las células sometidas a los tratamientos de MG-85 y MG-89 con diferentes concentraciones y el control.

La figura 19 representa el crecimiento y desarrollo celular producido tras la aplicación del tratamiento en las diferentes concentraciones frente al control. Podemos observar que, a altas concentraciones, como son 50 µg/ml y 25 µg/ml, tanto en MG-85 como MG-89, no existe proliferación celular, morfología normal ni desarrollo nuclear adecuado, como en el control.

En el caso de la concentración de 10 µg/ml, la presencia y distribución celular es mayor, asemejándose ligeramente al control, únicamente en el caso de la MG-89.

Para las concentraciones de 5 µg/ml y 1 µg/ml, la estructura y distribución celular, así como la presencia de núcleos en buen estado es más evidente, mostrando valores comparables a los del control.

Sin embargo, tanto la densidad como la confluencia celular son mayores en todas las concentraciones para la MG-89 frente a la MG-85.

4.5 Ensayo de apoptosis/necrosis

La realización de este ensayo ofreció como resultado la figura 20 en la que se muestran 4 cuadrantes en los que encontraremos diferentes densidades celulares y que indican:

- Q4: células vivas.
- Q3: células apoptóticas tempranas.
- Q2: células apoptóticas tardías.
- Q1: células necróticas.

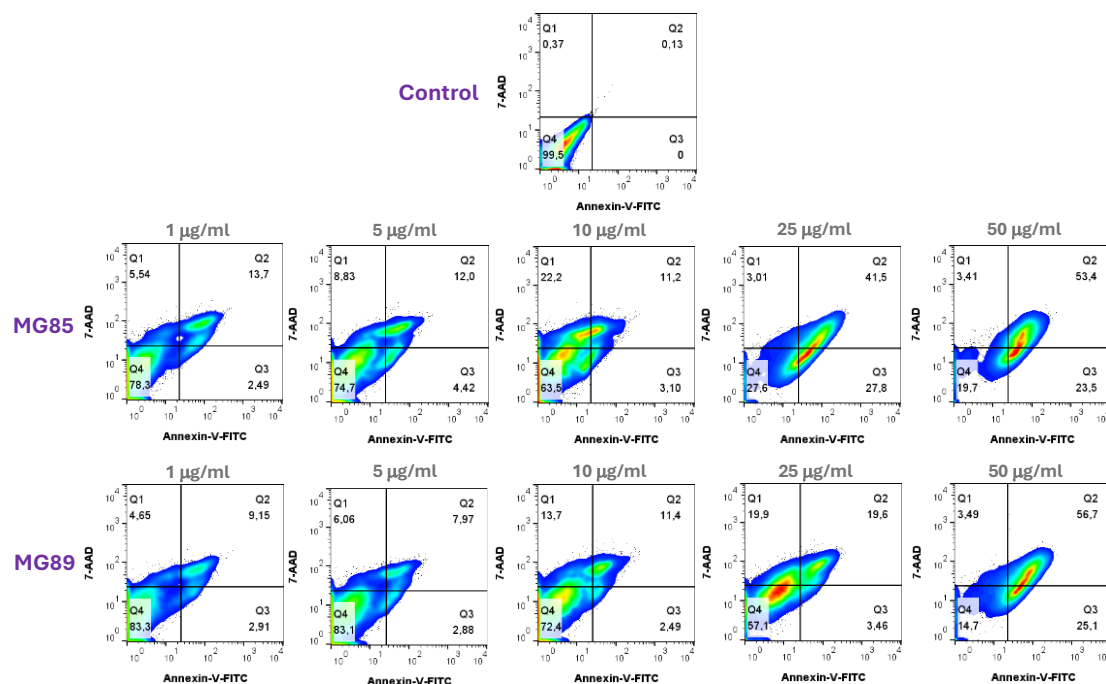


Figura 20. Citometría de flujo para el análisis de la necrosis/apoptosis celular para lo MG-85 y MG-89.

Como valor representativo de la normalidad celular apreciamos en el control la totalidad de la densidad celular en el Q4.

Para la MG-85 encontramos que para la concentración de 50 µg/ml, la mayor densidad celular (zona roja) se encuentra en Q2 (apoptosis tardía) superando la mitad de la densidad (53,4 %), con porcentajes similares para Q3 (apoptosis temprana) (23,5 %) y Q4 (células vivas) (19,7 %).

Para la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, la distribución es similar en cuanto a cuadrantes, pero disminuye el porcentaje de células en Q2 que baja a un 41,5 %. No es hasta que no disminuimos la dosis a 10 $\mu\text{g/ml}$ que encontramos valores más cercanos al control y alejamos la densidad celular del Q2. Es partir de esta densidad, que comenzamos a desplazar la figura hacia Q4, aunque mostrando mayor número de células necróticas, pero con mucha heterogeneidad en la muestra. Finalmente, para las concentraciones más bajas de la MG-85, encontramos cifras cercanas o superiores al 75 % en el cuadrante de células vivas, seguido en porcentaje por el de células apoptóticas tardías.

Los resultados de la MG-89 mostraron para la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, peores resultados en células vivas, con un 14,7 % y una distribución similar en el resto de los cuadrantes. Sin embargo, el porcentaje aumenta a un 57,1 % en la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, suponiendo una mejora muy significativa. Destaca, también, el aumento con esta concentración de la presencia de una densidad cercana al 20 % en el cuadrante de células necróticas. A partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, existe similitud entre Q1 y Q2, aunque representan un porcentaje menor del 15 % ya que la curva se desplaza al cuadrante que pasa a representar un 72,4 % del total. Para las dos concentraciones menores (1 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$), los datos son altamente similares mostrando porcentajes superiores al 83 % en células vivas, distribuyéndose el resto de manera similar en los demás cuadrantes.

4.6 Ensayo de la medición de especies reactivas de oxígeno intracelular

Mediante el uso del citómetro y el software de análisis se obtuvo la figura 21 para el análisis de las especies reactivas de oxígeno intracelular generadas en cada concentración de los tratamientos:

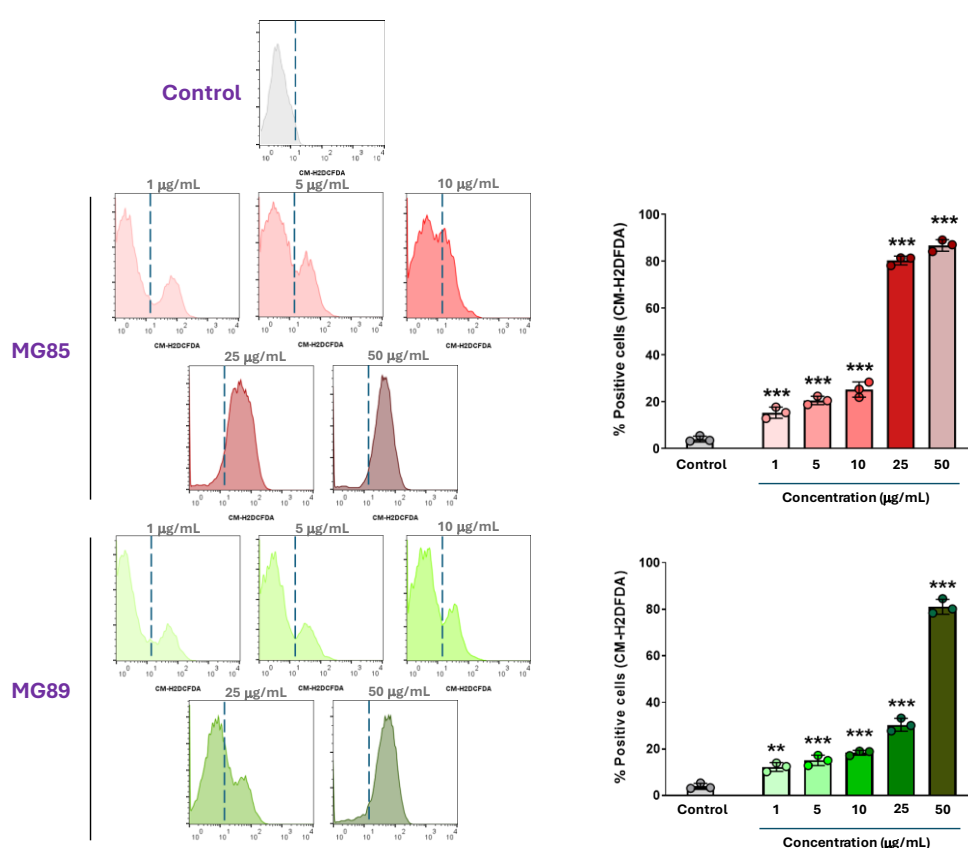


Figura 21. Histograma de fluorescencia (CM-H2DCFDA) del análisis de especies reactivas de oxígeno.

Podemos interpretar que tanto para la MG-85 (gráfica de columnas rosa), como para la MG-89 (gráfica de columnas verde), la diferencia frente al control es estadísticamente significativa con *** $p < 0,001$, exceptuando la concentración de 1 µg/ml de MG-89 donde se reduce a ** $p < 0,01$.

Para la MG-85, el porcentaje de producción de ROS es estadísticamente muy significativo desde la concentración más baja, sin embargo, es cuando alcanza los 25 $\mu\text{g/ml}$ que alcanza porcentajes de entre 80-100 mostrando diferencias muy significativas en las células pulpaes cultivadas con medio DMEM completo sin tratar.

Existe un crecimiento gradual de expresión de especies reactivas en el caso de la MG-89 manteniéndose por debajo del 40 % de células positivas a ROS, hasta que alcanza los 50 $\mu\text{g/ml}$ donde esta producción se dispara a porcentajes en el intervalo de 80 - 100.

Es deducible, por tanto, que la MG-85 produce mayor número de ROS, incluso a concentraciones más bajas, y que empeora especialmente a partir de la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$.

4.7 Ensayo de ELISA

El experimento realizado de ELISA para la cuantificación de interleucina 6 e interleucina 8 generada por ambos tratamientos en sus distintas concentraciones se obtuvieron las siguientes gráficas:

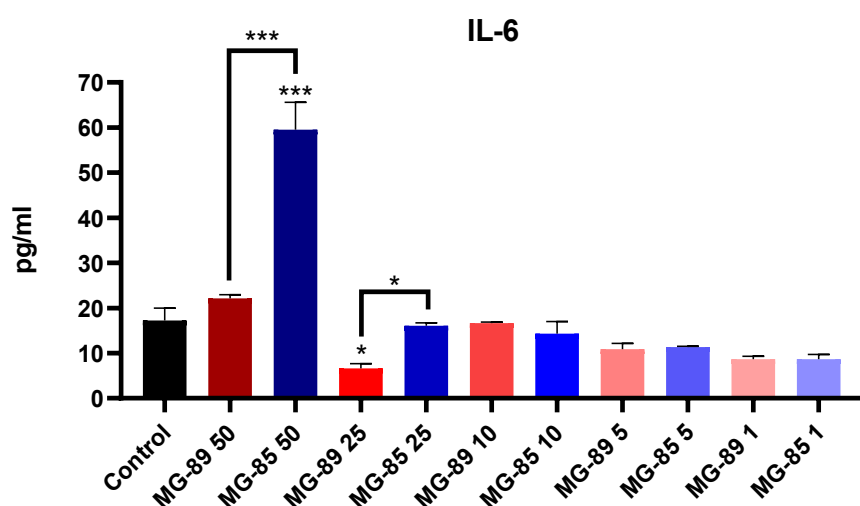


Figura 22. Gráfica para los resultados del ELISA en IL-6 para MG-85 y MG-89 y sus diferentes concentraciones.

En ella podemos observar valores estadísticamente muy significativos ($***p<0.001$) para la MG-85 en la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ superando al control, siendo a su vez muy significativa la diferencia ($***p<0.001$) frente a la misma concentración en la MG-89.

En la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, la cantidad de ROS generado en la MG-89 es estadísticamente significativa ($*p<0.05$), en esta ocasión por encontrarse por debajo del control, lo que podría traducir en una disminución de la inflamación. De nuevo siendo estadísticamente significativa ($*p<0.05$) frente a la misma concentración en el caso de la MG-85.

Para el resto de los tratamientos, las especies reactivas de oxígeno generadas se encontraban en valores similares o inferiores al control, pero sin diferencias significativas.

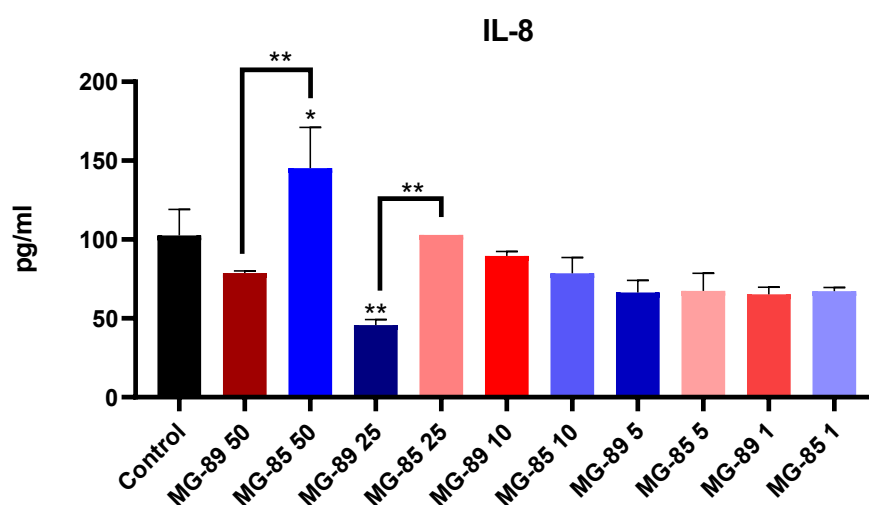


Figura 23. Gráfica de análisis resultado de un ELISA en IL-8 para los dos materiales en sus distintas concentraciones.

Para la IL-8, los resultados mostraron diferencias significativas ($*p<0.05$) frente al control en el caso de MG-85 en la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Siendo estadísticamente más significativa la diferencia ($**p<0.01$) en la misma concentración entre las muestras MG-89 y MG-85.

A su vez en el caso de MG-89 25 µg/ml podemos encontrar diferencias frente al control (**p<0.01) y la misma significación (**p<0.01) se expresa frente a la misma concentración en la MG-85; en esta ocasión la diferencia es por una menor producción de citoquinas, lo que se interpretaría como un efecto positivo para el organismo.

Tanto en IL-6 como en IL-8 existe una disminución de citoquinas en la concentración de 25 µg/ml para la MG-89.

5. DISCUSIÓN

5.1 Uso de las NPsAg como antiséptico

La búsqueda permanente de productos que permitan conseguir la mayor antisepsia posible previa a la obturación de cavidades dirige los proyectos de investigación a soluciones que aporten materiales de buena penetración, alta eficacia frente al mayor número posible de bacterias, baja o nula interferencia en otros factores como la adhesión, facilidad de uso y baja toxicidad (143).

Los estudios que respaldan el uso de NPsAg evidencian su amplio espectro de actuación en bacterias: inhiben la replicación del ADN, degradan el citoplasma y modifican los niveles de ATP. Las bacterias gram positivas presentan en su pared celular una membrana de peptidoglicano que le confiere carga negativa e interacciona con la carga positiva de los iones de las NPsAg. Del mismo modo ocurre con los lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas. Es por ello por lo que son efectivas frente a ambas y se utiliza un agente de recubrimiento para su modulación y estabilización (144).

Las NPsAg provocan en las bacterias alteración de la cadena respiratoria por un aumento del estrés oxidativo gracias a su interacción con los grupos tiol que eleva el número de especies reactivas de oxígeno, efecto que se estudia con células de pulpa dental en este proyecto. Además, presentan la capacidad de inhibir los métodos de comunicación entre bacterias lo que inhibe la producción de sustancias extracelulares como los polisacáridos presentes en la matriz extracelular y contribuyen a la formación del biofilm (145). En el estudio realizado por Seikh y cols. (146) se demostró la capacidad de disminución de formación en el biofilm en bacterias como *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* cuando se usaban NPsAg sintetizadas a partir de jengibre.

Es la capacidad de producción de radicales hidroxilo y superóxido, sin la necesaria presencia de células, y su capacidad de estos radicales de provocar daños en moléculas intracelulares, lo que otorga a las NPsAg la versatilidad en su uso (134, 147).

Estudios como el de Swolana y cols. (134) muestran una disminución de viabilidad bacteriana en concentraciones de NPsAg de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ donde se explica cómo el uso de éstas en concentraciones subcitotóxicas podrían provocar una adaptación bacteriana con un aumento en la producción del biofilm.

5.2 El tamaño de las NPsAg

El tamaño de las NPsAg es uno de los temas recurrentes de investigación, ya que ha existido controversia en su efecto citotóxico frente a las células. Algunos trabajos afirman que aquellas partículas de más tamaño, como pueden ser 40, 50, 75 ó 100 nm, presentan menos genotoxicidad que aquellas más pequeñas de 5, 10 ó 20 nm (148, 149).

Un factor importante a considerar es la heterogeneidad en la metodología de estudio. El artículo de Guo y cols. (148), en el que se estudia la capacidad bactericida de las NPsAg, se utiliza el test de Ames para evaluar la toxicidad en bacterias mediante la capacidad de producción de histidina en la *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, la incapacidad de fagocitosis de las NPsAg por parte de las bacterias, invalida este ensayo como referencia, ya que no penetra ni afecta a las estructuras intracelulares.

En nuestros ensayos se utilizaron nanopartículas de dos tamaños distintos: $18,83 \pm 8,86$ nm (MG-85) y de $3,67 \pm 1,06$ nm (MG-89), lo que ha permitido probar si aquellas partículas más pequeñas son las más citotóxicas, como sugieren otros autores (150).

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos apuntan a peores resultados en la biocompatibilidad para MG-85, donde el tamaño de partícula es mayor. Esta hipótesis estaría respaldada por estudios como el de Perde-Schleper y cols. (151) de 2019 donde se demostró que el efecto genotóxico de las NPsAg en células cocleares era directamente dependiente del tamaño, siendo más perjudicial a mayor tamaño de partícula; así como otros estudios han encontrado mayor toxicidad en las partículas de mayor tamaño frente a aquellas más pequeñas (152).

Sin embargo, autores como Lebedová y cols. (153) encontraron que la relación entre el tamaño y su efecto no se presentaba como una evidencia clara cuando se estudiaban partículas de 5 y 50 nm. Por otro lado, los resultados en el ensayo del cometa (*comet assay*) de Gliga y cols. (150), mostraron mayor citotoxicidad en partículas más pequeñas por su mayor liberación de iones de plata al medio. Al igual que, Wang y cols. (154) en 2013 que probaron la mayor toxicidad de NPsAg de 20 nm por su biodisponibilidad y capacidad de disolución.

La mayoría de los estudios concuerdan en que tamaños superiores a 50 nm presentan alta toxicidad y existe poca evidencia en aquellos inferiores a 5 nm.

La relación definitiva parece encontrarse en el área superficial de las NPsAg. La reducción del tamaño molecular implica una menor masa de cada NP y mayor cantidad de NPs necesarias para la misma masa, por lo que existe un aumento en el área superficial y una disminución en el volumen. Esto supone una mayor superficie de exposición de los átomos y, por tanto, mayor número de interacciones biológicas (155). Por este motivo, frente a la misma masa molecular, podemos encontrar diferencias en su toxicidad dependiendo de la morfología o cobertura que presenten las NPsAg como sugieren Sharma y cols. (95). Esta teoría estaría en concordancia con otra de las características que diferencia a nuestros materiales como son el grado de aglomeración.

Es por ello por lo que debemos considerar que tanto el mayor tamaño de partícula de MG-85, como su mayor grado de aglomeración, podrían estar afectando en su modo de acción.

5.3 Morfología de las NPsAg

Otro de los temas de discusión sobre las NPsAg y cómo afectan a su modo de acción es la morfología que estas presentan. La morfología nos va a aportar diferentes aspectos relevantes ya que determinan: la superficie de contacto, la capacidad para liberar iones, el método de interacción con las membranas de las células y el número y tipo de facetas

cristalinas expuestas. Todas estas características están muy relacionadas con la toxicidad celular.

Las NPsAg de nuestro estudio presentan similitud en su morfología esférica, presentando, sin embargo, MG-85 más irregularidades en su perímetro. Artículos como el de Chen y Schluesener (156) o el de Pal y Tak (157) demuestran que aquellas NPsAg que presentan forma triangular presentan mayor capacidad antibacteriana; sin embargo, cuando se trata de la supervivencia celular, esta morfología puede ser perjudicial. En el artículo de Pal y Tak (157) se explica que el hecho de que sean triangulares o prismáticas genera mayor número de irregularidades y por tanto más exposición de las facetas cristalinas, esto nos ayudaría a comprender por qué en nuestros ensayos, las MG-85 que presentaban una morfología quasi-esférica podrían estar provocando mayor daño celular, en comparación con las MG-89 con morfología esférica regular.

Las NPsAg esféricas se consideran las más estables, su liberación de iones es la más gradual y, por tanto, se consideran las menos citotóxicas, aunque conservan su capacidad de entrada celular por su interacción con los grupos tiol de la membrana.

Las cúbicas, sin embargo, son menos reactivas y su liberación de iones y efectividad es menor. Para las varillas o bastones, encontramos una mayor penetración en la membrana y por tanto más producción de ROS. Por último, las estrelladas presentan una alta rugosidad, con gran exposición de cristales y escasa estabilidad, lo que generará una alta genotoxicidad, según la literatura (158, 159).

Hemlinger y cols. (160) realizaron un estudio donde se utilizaban NPsAg de distintas morfologías, estabilizadas con el mismo polímero, PVP. En él encontraron que todas las morfologías eran citotóxicas para las células cuando la concentración superaba los 12,5 µg/ml; sin embargo, para las bacterias sí que encontraban cambios en su efectividad. Estos datos reforzarían lo hallado en los experimentos donde existe mayor tasa de supervivencia celular en aquellas NPsAg de morfología esférica regular, incluso en concentraciones más altas.

5.4 La carga superficial de las NPsAg

La relevancia del papel de la carga en los efectos de las NPsAg ha sido cuestionada en diversas ocasiones, siendo catalogada por algunos autores como inconclusos, de poca trascendencia o de poca evidencia (149, 161, 162). En la revisión de Rodríguez-Garraus y cols. (163) se muestran numerosos estudios donde no existe correlación entre el revestimiento de las NPsAg y su acción. Por otro lado, en el estudio de Vikovic y cols. (164) se analiza, para conocer la influencia de la carga, elementos como los micronúcleos generados como señal de daño genético, así como las especies reactivas de oxígeno producidas.

Actualmente se ha demostrado que la carga influye en la acción de las NPsAg modulando su estabilidad en la suspensión y aglomeración; su interacción con las membranas celulares o bacterianas y, por tanto, su efectividad; y su toxicidad, debido a que la interacción favorecerá su entrada o no en los organismos vivos. Es vital en este aspecto el papel que tiene el recubrimiento de las NPs (132).

En cuanto a la carga de las NPsAg se refiere, encontramos tres posibilidades: NPsAg con carga negativa, NPsAg con carga positiva y NPsAg de carga neutra. Los estudios realizados con distintos tipos celulares muestran que las NPsAg con carga negativa son sintetizadas y estabilizadas con citratos o con un polímero soluble en agua de polivinilpirrolidona (PVP). La carga negativa provoca un efecto de repulsión superficial, dificultando su interacción celular y penetración. Es por ello por lo que, el citrato mejora su acción ya que favorece la unión a las proteínas por estabilización electrostática, permitiendo que las NPsAg no se aglomeren y se repelan entre ellas. Además de proporcionarle una mayor superficie de contacto (165). El PVP, por otro lado, mejora la estabilidad porque impide la repulsión estérica (por solapamiento de nubes electrónicas) (166-168).

Las NPsAg con carga positiva, en cambio, muestran, según Ivask y cols. (169), una mayor genotoxicidad debido a la mejor adhesión celular e internalización que se produce en estas, frente a aquellas de carga negativa con citrato como revestimiento. Otros autores probaron que, aquellas NPsAg recubiertas con PEI que confería carga positiva,

presentaban mejores efectos antibacterianos por su capacidad de unirse a las membranas bacterianas, las cuales presentan una carga negativa, por medio de fuerzas electrostáticas; provocando así un mayor tiempo de contacto y, por tanto, mayor efectividad (170, 171).

En cuanto a las NPsAg neutras sin revestimiento, los resultados parecen ser inconclusos. Wang y cols. (172) encontraron resultados que apuntaban a una mayor toxicidad de estas frente a las de carga negativa, sin embargo, los resultados no fueron así en todos los ensayos que realizaron en este estudio. Debemos comprender que, aunque la carga inicial sea neutra o negativa, el hecho de que presente un estabilizador como el citrato hará que exista mayor interacción celular y que, por tanto, sea más citotóxico que su forma sin recubrimiento. Esto explica que aquellas NPsAg neutras presenten una interacción celular moderada con una toxicidad media que dependerá mayormente de su agente estabilizante (173).

Por otro lado, algunos autores, que han estudiado tanto la carga como el tamaño, encuentran que este segundo factor podría ser más relevante (148). En un estudio de 2010 (174) se demostró que los grupos tiol y citrato podían reducir la velocidad de liberación de las NPsAg, mientras que se podría acelerar la misma con una preoxidación de la partícula o la reducción de su tamaño. Los polímeros también actúan alterando la liberación de los iones, ya que almacenan y liberan las reservas de plata de la superficie.

Las NPsAg utilizadas en este estudio, presentan cobertura de PEI, lo que les confiere carga positiva y, por tanto, mayor afinidad por las células. Esto podría explicar que los resultados muestren su mayor toxicidad especialmente en cantidades superiores a 10 µg/ml. El que la cobertura para las dos muestras de NPsAg sea la misma, nos permite descartar esta variable para analizar la citotoxicidad en otros aspectos en los que las muestras ya difieren como la forma, la cantidad o el tamaño.

5.5 Dosis total y la concentración de NPsAg

La dosis y la concentración en que se aplican las NPsAg es un factor relevante en la utilización de estas. La gran heterogeneidad en los estudios en cuanto a la cantidad de NPsAg utilizadas, así como en el tipo de célula a las que se aplican, dificulta la comparativa entre estudios (175). Las concentraciones utilizadas en nuestros experimentos fueron obtenidas mediante el IC_{50} , donde se determinó que concentraciones por debajo de 50 $\mu\text{g/ml}$ considerando las características físicas de las NPsAg de MG-89 y MG-85.

Con relación a las concentraciones de NPsAg, existen algunos estudios como el de Halkai y cols. (176), en los que se utilizan células de fibroblastos gingivales, donde se define el rango de concentraciones en menos de 260 $\mu\text{g/ml}$, lo que muestra una alta tolerancia por parte de las células. Sin embargo, en este estudio debemos considerar, que se desconoce la forma o tamaño de las NPsAg y que no se trata de células de pulpa dental.

En células pulpares, en el trabajo de Mahmoud y cols. (129), se utilizan NPsAg en gel a una concentración de 0,01%, 0,015% a 0,02 % (100-200 $\mu\text{g/ml}$), encontrando resultados de viabilidad superiores al 92 % de las células a las 24 h, así como una eficacia similar a la del hidróxido de calcio cuando se usa como medicación intraconducto en tratamientos endodónticos. Es reseñable que la mayor citotoxicidad se encuentra en el grupo de NPsAg al 0,01 %, entre todos los del estudio que incluyen NPsAg en concentraciones de 0,015%, 0,02% y Ca (OH).

En concentraciones más bajas, Laredo-Naranjo y cols. (177) decidieron utilizar NPsAg en una concentración de 0,06 $\mu\text{g/ml}$ con titanio en células pulpares aplicando en cada uno de los grupos concentraciones del 100 %, 50 % y 16 %. Los resultados mostraron la mayor viabilidad en el grupo de la concentración de 16 %, siendo esta mayor que uno de los grupos control en el que se utilizó clorhexidina al 0,12 %. En este estudio probaron la capacidad antimicrobiana de las NPsAg frente a *P. gingivalis* y *S. mutans*, presentando mejores resultados para *P. gingivalis*. Estos resultados apoyan nuestros resultados, en los que las concentraciones más bajas ofrecen la mejor biocompatibilidad celular.

Concentraciones similares se usaron en el estudio de Zorraquín-Peña y cols. (178) con la diferencia de que las NPsAg fueron estabilizadas con glutatión (GSH-NPsAg). En ellos se obtuvo una inhibición en el crecimiento bacteriano, especialmente para *S. mutans*. Sin embargo, la citotoxicidad se veía aumentada cuando a medida que lo hacían las concentraciones de GSH-NPsAg, incrementando también la producción de citoquinas. Lo que se interpreta como una dosis efectiva a nivel antimicrobiano, pero de baja biocompatibilidad.

La literatura existente apoya los resultados obtenidos en nuestra investigación en los que encontramos relación directa entre la dosis y la citotoxicidad. Demostrando que dosis superiores a 10 µg/ml dan lugar a altas tasas de necrosis y apoptosis celular, así como a producción de especies reactivas de oxígeno.

5.6 Ensayo de actividad metabólica

Los ensayos de actividad metabólica realizados en esta tesis deben considerarse teniendo en cuenta dos factores: el tamaño medio de las NPsAg y la concentración de cada una de las diluciones.

Teniendo en cuenta aquellos estudios previamente expuestos sobre la influencia del tamaño (151, 152), sería coherente considerar que la MG-89, que presenta un tamaño medio de 3,6 nm, presente menos diferencias estadísticamente significativas con el control, en cuanto a la actividad metabólica registrada, que la MG-85 de 18,8 nm de media.

Por otro lado, nuestros resultados arrojan una mejoría notable cuando las diluciones presentan una menor concentración. Los experimentos aportan resultados con diferencias estadísticamente significativas frente al control para todas las concentraciones, excepto en las de 5 y 1 µg/ml, donde existiría biocompatibilidad similar al control.

Es reseñable también, la similitud en los resultados con respecto al control en la concentración de 5 µg/ml a las 24 h, siendo diferente y estadísticamente significativa con el paso de las horas. Podría interpretarse esto como un mayor efecto citotóxico o una afectación a nivel metabólico de las NPsAg, que dependería también del tiempo de exposición de las células. Como también probaron Paknejadi y cols. (179) en su trabajo con fibroblastos de la piel.

También existen estudios como el de Fu y cols. (180) que realizan el ensayo MTT en células de ligamento periodontal con NPsAg de tamaños iguales o superiores a los de nuestro ensayo, con obtención de resultados muy positivos. Esto sugiere que la citotoxicidad podría ser también dependiente de la línea celular utilizada.

5.7 Ensayo de migración celular

Los resultados en el ensayo de migración celular muestran una respuesta deficiente por parte de las células expuestas a las concentraciones más altas. Podemos apreciar en las imágenes captadas por el microscopio, principalmente en el grupo de la MG-85, algunas figuras irregulares compatibles con depósitos de NPsAg. Este hecho podría estar relacionado con la capacidad de aglomeración que estas presentan y que provoca su deposición en el fondo de los pocillos. También se encontraron células redondeadas y sin desarrollo del citoesqueleto. Estos resultados coinciden con los expuestos por Watanabe y cols. (181) donde encontraron daños en la membrana celular y células encogidas.

Para aquellas concentraciones más bajas y especialmente en la muestra de MG-89, la morfología celular parece adecuada, así como los tiempos de cierre de la herida, similares al control.

La metodología de los experimentos influye y es relevante, incluso cuando se utilizan materiales similares, como en la revisión de Rodríguez-Garraus y cols. (163), donde se

considera un factor crucial el centrifugado de las células una vez se ha aplicado el tratamiento. Este método es utilizado para quitar los restos de partículas que hayan podido quedar adheridas a las células, sin embargo, esta separación no siempre es completa y otorga especial sensibilidad cuando se trata de estudios que requieren una incubación de horas o días, como es el caso de este experimento. Esto podría haber alterado los resultados por la deposición indeseada de partículas en el fondo de los pocillos.

Con relación a nuestros resultados, donde se observa afectación de orgánulos y de la membrana celular, algunos autores explican que, el mecanismo de afectación celular está directamente relacionado con la alteración en la expresión de las moléculas de la matriz extracelular, y que existe una disminución de las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 6$ del integrín $\beta 1$, receptores de integrina y laminina, respectivamente. Esto supone cambios en la reorganización del citoesqueleto, la migración celular y afecta negativamente a la expresión de moléculas de la matriz extracelular (182). Lo que confirmaría las imágenes obtenidas en los diferentes rangos horarios en nuestro ensayo.

5.8 Ensayo de ROS

En este ensayo encontramos en todas las concentraciones un aumento de ROS, destacando que, en las dosis más bajas de NPsAg, las diferencias no son significativas. Sin embargo, el aumento de la dosis sí que produce diferencias significativas entre ambas muestras, siendo mayor para las NPsAg de mayor tamaño (MG-85). Esto podría interpretarse como una mayor capacidad de interacción entre las células y aquellas partículas que presentan una superficie más grande para generar estrés oxidativo.

La interacción celular con las NPsAg se produce a la vez con los iones de plata liberados y con el recubrimiento de la superficie que presentan, de esta manera obtendremos dos reacciones a nivel celular de manera independiente. Por ello Agnihotri y Mukherji (183) estudiaron el efecto de las NPsAg inmovilizadas en una superficie amino-funcionalizada para evitar la liberación de iones Ag^+ y demostraron, así, que su efectividad estaba

basada en el contacto directo con la célula. Esto descartaría la hipótesis anterior y refuerza que la mayor presencia de ROS se base en un mayor tamaño de las partículas de NPsAg y por tanto un mayor contacto de superficie. Lo que concuerda también con los resultados encontrados en nuestro ensayo donde las partículas de mayor tamaño, MG-85, son las que producen mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno. La producción de estas ROS y radicales libres dañará el funcionamiento intracelular y activará los mecanismos de apoptosis celular (171).

5.9 Ensayo de inmunofluorescencia

En nuestro estudio, las imágenes captadas con el microscopio de contraste de fases con inmunofluorescencia mostraron, en aquellas concentraciones más altas, células despegadas y redondeadas. Estos resultados coinciden con los de Sheaikpranbabu y cols. (184), que describen células endoteliales despegadas, redondeadas y con filamentos de actina colapsados como consecuencia de la presencia de productos de glicación avanzada. Así como, en una revisión reciente sobre células eucariotas tratadas con NPsAg, se observaron orgánulos celulares afectados por dosis no citotóxicas (0,5-2 $\mu\text{g/ml}$) de NPsAg, con vacuolas autofágicas y autolisosomas; mientras que, en dosis tóxicas (6 $\mu\text{g/ml}$), los resultados mostraron membranas y orgánulos destruidos, distorsión de la membrana nuclear, formación de núcleos abultados y vacuolas autofágicas con desechos. En el citoplasma se encontraron restos lipídicos, mitocondrias con sus membranas hinchadas y cisternas de Golgi dilatadas (185).

Podemos deducir, de nuestros resultados y de la literatura mencionada, que existe una afectación en la morfología y distribución de las células pulpares, así como de sus orgánulos, cuando las NPsAg son utilizadas en cantidades superiores a 10 $\mu\text{g/ml}$ destacando para MG-85.

5.10 Ensayo de apoptosis/necrosis

Los resultados del estudio de la apoptosis/necrosis muestran que existe una tendencia mayor hacia una apoptosis temprana en dosis altas de NPsAg, mientras que, al reducir la concentración, los valores se dispersan mostrando una leve tendencia a la necrosis y en general, mayor porcentaje de células vivas.

Esto explicaría por qué, en estudios como el de Xiong y cols. (186) probaron el uso de las NPsAg como coadyuvante en el tratamiento de cáncer de mama, por su eficacia en la inducción de apoptosis en eritrocitos cancerígenos. El mecanismo consistiría en el aumento de producción de proteínas apoptóticas de la vía intrínseca mitocondrial (Bak-1) y disminución de Bcl- XL (antiapoptótica), así como de la proteína caspasa-3, induciendo así la apoptosis de estas células a través de las mitocondrias. Estos hallazgos coinciden con los encontrados por Youssef y cols. (187), en su estudio histológico e inmunológico con células de pulpa dental, donde también se observó un descenso en el factor endotelial de crecimiento vascular y aumento en la expresión de caspasa-3.

La apoptosis de células pulpares está relacionada directamente con la dosis de NPsAg, como se menciona en el apartado sobre la cantidad, a su misma vez, explicada por el aumento del estrés oxidativo y generación de especies de ROS. El aumento de especies reactivas del oxígeno provoca daños en la membrana celular y mitocondrial de la siguiente manera: aumento de poros en mitocondrias por la mayor presencia de Bak1 y, por tanto, mayor liberación de las especies reactivas de oxígeno que se encontraban dentro de la mitocondria; y la disminución de Bcl-xl que representa uno de los mecanismos de defensa de la mitocondria y permite modular la liberación de citocromo C y ROS. Estos dos efectos provocan un mecanismo de retroalimentación que conducen a la apoptosis celular (186).

Este aumento de ROS demostrado en otro apartado justifica la tendencia que presentan las células en el experimento. Al igual que por este motivo en el estudio de Laredo-Naranjo y cols. (177) encuentra altos porcentajes de citotoxicidad celular en altas concentraciones en contraste con porcentajes de supervivencia del 95% de las células

cuando la concentración de NPsAg era menor. Estos resultados coinciden con los encontrados en nuestro estudio, tanto en producción dosis-dependiente de ROS como en el ensayo de apoptosis/necrosis donde a bajas concentraciones la supervivencia era similar a la del control.

5.11 Ensayo de medición de citoquinas

Los resultados obtenidos en el experimento para cuantificar la producción de interleucina 6 e interleucina 8 mostraron niveles similares al control, con la excepción de las concentraciones de 50 µg/ml y 25 µg/ml para MG-89, en las que los niveles disminuyen por debajo del control. Lo que podría interpretarse como un posible efecto antiinflamatorio. También encontramos valores superiores al control en la dosis de 50 µg/ml de MG-85, siendo estadísticamente significativa frente a la misma dosis en MG-89.

Los niveles altos de IL-6 y de IL-8 causados por el uso de NPsAg han sido ya reportados por autores como Manke y cols. (188), quienes lo asociaron con aumento de la producción de ROS, así como la activación de factores de la cascada inflamatoria como el NF-κB/MAPK. Estos datos confirmarían los resultados de la mayoría de las concentraciones, pero no las de aquellas que disminuyeron su respuesta. Sobre estas excepciones encontramos el trabajo de Steckiewicz y cols. (189) que explica que la respuesta a las NPsAg va a ser dependiente de su tamaño, recubrimiento y dosis, entre otros factores. Dando distintos resultados que llevarán en ocasiones a una necroptosis, donde habrá un aumento de proteínas RIP1, RIP3 y MLKL; y en otras a apoptosis, donde se elevarán los niveles de caspasa-2.

Podríamos interpretar de las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras a la misma concentración, ya que ambos materiales presentan el mismo recubrimiento, que es el tamaño de las NPsAg lo que, hipotéticamente, produzca menos daño a la célula o la menor aglomeración que presenta la MG-89 frente a MG-85, lo que produzca este efecto antiinflamatorio. Es interesante considerar también la liberación de

iones, que muestra cada una de las muestras y que está directamente relacionada con la inflamación como estudiaron Sun y cols. (190).

5.12 Limitaciones del estudio y perspectivas futuras

- Limitaciones del estudio

Las limitaciones de este estudio implican que los experimentos llevados a cabo han sido realizados de manera *in vitro*, lo que supone la incapacidad de replicar de manera exacta las condiciones biológicas que se darían en una cavidad dental donde existen diferentes espesores dentinarios en función de la profundidad de la caries. Para intentar encontrar una concentración adecuada de los materiales en contacto directo con las células pulpaes se realizó el experimento del IC₅₀, sin embargo, se debe considerar que estas dosis no son las que realmente entrarán en contacto con el diente, ya que dependerá de otros factores como el material con el que se combine, la permeabilidad tubular, el estado de inflamación pulpar o el espesor dentinario.

En nuestros experimentos se ha evaluado la biocompatibilidad de las nanopartículas de plata sobre células de pulpa, en las que se ha podido evaluar su efecto en distintos intervalos horarios, sin embargo, otra limitación de nuestro estudio fue la imposibilidad de discernir si, en los tratamientos, influía el recubrimiento de las NPsAg o la liberación de iones de estas, siendo necesarias más investigaciones que aborden estos aspectos. Debemos contemplar que el comportamiento de las NPsAg dependerá del material que se utilice para su aplicación y que es importante conocer las dosis biocompatibles en contacto directo con células pulpaes para desarrollar otros productos que las contengan en porcentajes adecuados.

- Perspectivas futuras

Los resultados obtenidos ofrecen la posibilidad del desarrollo de nuevos materiales en los que estén presentes estas NPsAg en las dosis indicadas, a través de los cuales se

puedan aprovechar sus propiedades de manera más práctica. El siguiente paso sería el desarrollo de estos y su posterior análisis para su replicación *in vivo* con animales de experimentación.

Es de gran relevancia tener en consideración que los estudios sobre el uso de las NPsAg como desinfectante dentinario se centran en bacterias como *E. faecalis* (anaerobia facultativa) que se encuentra presente en casos de necrosis pulpar o fracaso endodóntico. En otros estudios como el de Nia y cols. (191) se utilizaron bacterias como *P. aeuroginosa* (aerobia facultativa), donde se muestra una mejor respuesta por parte de las NPsAg en comparativa con la clorhexidina. Sin embargo, esta es una bacteria oportunista presente en lesiones de periodontitis avanzada o refractaria y raramente encontrada en lesiones cariogénicas.

La investigación sobre los efectos de las NPsAg en dentina debe estar relacionada con las células pulpares por su proximidad, así como con aquellas bacterias presentes en dientes con vitalidad pulpar e infección cariogénica. Es por ello por lo que el desarrollo de investigaciones en esta dirección sería de gran interés para poder encontrar las dosis adecuadas que actúen frente a estos patógenos pero que respeten la biocompatibilidad de las células pulpares.

Es preciso tener en cuenta en futuros estudios la genotoxicidad, la cual representa la capacidad que tiene un material para provocar cambios en el ADN celular. Esta propiedad se encuentra regida por el Consejo Internacional de Armonización de Requisitos Técnicos para fármacos de Uso Humano (ICH), el cual impone las guías para la experimentación e interpretación de datos referidos a este tema (163). En esta guía se proponen dos formas de analizar la genotoxicidad provocada por las nuevas sustancias; sin embargo, esta guía se enfoca en materiales compuestos por “moléculas pequeñas” sin especificar el uso de NPs en concreto.

La problemática surge de la incapacidad de las bacterias para internalizar las NPs, lo que supone que mucha de la literatura publicada no sea validada, como advierte la revisión sistemática de Rodríguez-Garraus y cols. (163). Para ello, organizaciones como ISO y la EFSA recomiendan el uso de células de mamíferos para los ensayos sobre

biocompatibilidad en NPs (163). Además, cuando las células fagocitan las NPsAg lo hacen por medio de vesículas que quedan almacenadas en el citoplasma y que, por tanto, no entran en contacto con el núcleo. Únicamente, cuando se produce la fragmentación del ADN para el proceso de mitosis, podemos encontrar este efecto de genotoxicidad (168). De esta manera estaremos considerando en estos estudios tanto la biocompatibilidad celular que representa la toxicidad global celular, como la genotoxicidad que mostrará el potencial daño genético producido.

6. CONCLUSIONES

El estudio *in vitro* sobre biocompatibilidad y citotoxicidad de células pulpares tratadas con NPsAg llevado a cabo con dos materiales, MG-89 y MG-85, ofreció como resultado una mayor biocompatibilidad del primer material mencionado. La distinta respuesta de las células pulpares a los materiales en función de la concentración utilizada reveló que este es un factor determinante para su aplicación. Las concentraciones bajas mostraron resultados similares en biocompatibilidad, destacando en ocasiones de manera significativa aquellas NPsAg de tamaño más pequeño (MG-89).

Los ensayos realizados mostraron los siguientes datos:

- En el ensayo de IC_{50} , la concentración de MG-89 fue mayor a la obtenida para MG-85. Existe, por tanto, mayor tolerancia a dosis mayores de MG-89.
- Existe mayor actividad metabólica en aquellas células tratadas con concentraciones menores a 10 $\mu\text{g/ml}$ con ambas NPsAg. Sin embargo, se encontraron más similitud en los datos obtenidos para la MG-89.
- Los resultados de la migración celular mostraron rangos similares al control en el cierre de la herida, siendo menos efectivos especialmente para MG-85 cuando la concentración aumentaba.
- El ensayo de la inmunofluorescencia mostró similitud con el control en los citoesqueletos y morfología celular en concentraciones menores de 10 $\mu\text{g/ml}$ para la MG-89. Sin embargo, para la MG-85 la afectación era mayor y el grado de confluencia menor.
- El ensayo de ROS evidenció mayor producción de especies reactivas de oxígeno en MG-85 que en MG-89. Presentando valores mayores al control en todas sus concentraciones.
- Los valores de interleucina 6 e interleucina 8 fueron similares al control en todas sus concentraciones. La MG-89 presentó un descenso en la producción de citoquinas a altas concentraciones lo que sugiere un efecto antiinflamatorio.

- Los resultados sobre apoptosis/necrosis revelaron porcentajes de supervivencia celular inferiores al 20% para concentraciones altas en ambos materiales. La MG-89 provocó menores tasas de necrosis y apoptosis celular.
- Ambas nanopartículas, independientemente del tamaño y aglomeración, pueden ser biocompatibles en concentraciones de 5 µg/ml y 1 µg/ml.

7. REFERENCIAS

1. Alexander JW. History of the medical use of silver. *Surg Infect (Larchmt)*. 2009;10(3):289-292.
2. Xu L, Wang YY, Huang J, Chen CY, Wang ZX, Xie H. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*. 2020;10(20):8996-9031.
3. Shanmuganathan R, Karuppusamy I, Saravanan M, Muthukumar H, Ponnuchamy K, Ramkumar VS, et al. Synthesis of Silver Nanoparticles and their Biomedical Applications - A Comprehensive Review. *Curr Pharm Des*. 2019;25(24):2650-60.
4. Pugazhendhi A, Edison TNJI, Karuppusamy I, Kathirvel B. Inorganic nanoparticles: A potential cancer therapy for human welfare. *Int J Pharm*. 2018;539(1-2):104-111.
5. Haugen HJ, Makhtari S, Ahmadi S, Hussain B. The Antibacterial and Cytotoxic Effects of Silver Nanoparticles Coated Titanium Implants: A Narrative Review. *Materials (Basel)*. 2022;15(14):5025.
6. Mali S. Nanomedicine-next generation technology revolutionizing medical practice. *J Maxillofac Oral Surg*. 2013;12(1):1-2.
7. Agnihotri R, SG R, Albin S. Nanometals in dentistry: applications and toxicological implications-a systematic review. *Int J Dent*. 2019; 2019:123-30.
8. Zor F, Selek FN, Orlando G, Williams DF. Biocompatibility in regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*. 2019;14(20):2763-2775.
9. Bapat RA, Chaubal TV, Joshi CP, Bapat PR, Choudhury H, Pandey M, et al. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;91:881-898.
10. Song W, Ge S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules*. 2019;24(6):1033.
11. Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Salehi Y, Fard MJ. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *J Dent*. 2015;43(12):1573-1579.
12. Cao W, Zhang Y, Wang X, Li Q, Xiao Y, Li P, et al. Novel resin-based dental material with anti-biofilm activity and improved mechanical property by incorporating

hydrophilic cationic copolymer functionalized nanodiamond. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29(11):162.

13. Wang Q, Zhang Y, Li Q, Chen L, Liu H, Ding M, et al. Therapeutic Applications of Antimicrobial Silver-Based Biomaterials in Dentistry. *Int J Nanomedicine*. 2022;17:443-62.

14. Sati A, Ranade TN, Mali SN, Ahmad Yasin HK, Pratap A. Silver Nanoparticles (NPsAg): Comprehensive Insights into Bio/Synthesis, Key Influencing Factors, Multifaceted Applications, and Toxicity-A 2024 Update. *ACS Omega*. 2025;10(8):7549-7582.

15. Gunawan C, Marquis CP, Amal R, Sotiriou GA, Rice SA, Harry EJ. Widespread and Indiscriminate Nanosilver Use: Genuine Potential for Microbial Resistance. *ACS Nano*. 2017;11(4):3438-3445.

16. Love Z, Wang F, Dennis J, Awadallah A, Salem N, Lin Y, et al. Imaging of mesenchymal stem cell transplant by bioluminescence and PET. *J Nucl Med*. 2007;48(12):2011-2020.

17. Jaffer FA, Weissleder R. Molecular imaging in the clinical arena. *JAMA*. 2005;293(7):855-862.

18. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. 2008;452(7187):580-589.

19. Vizirianakis IS. Nanomedicine and personalized medicine toward the application of pharmacotyping in clinical practice to improve drug-delivery outcomes. *Nanomedicine*. 2011;7(1):11-17.

20. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(2):133-149.

21. Damle A, Sundaresan R, Rajwade JM, Srivastava P, Naik A. A concise review on implications of silver nanoparticles in bone tissue engineering. *Biomater Adv*. 2022;141:213099.

22. Kumar SSD, Rajendran NK, Houreld NN, Abrahamse H. Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications. *Int J Biol Macromol*. 2018;115:165-175.

23. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(14):1413-1433.
24. Hu E, Bayindir-Buchhalter I, Goebel U. Nanomedicine, Biofabrication, Tissue Engineering and Much More - Advanced Healthcare Materials Welcomes 2019. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(1):e1801576.
25. Saafan A, Zaazou MH, Sallam MK, Mosallam O, El Danaf HA. Assessment of Photodynamic Therapy and Nanoparticles Effects on Caries Models. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(7):1289-1295.
26. Yamanaka M, Hara K, Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):7589-7593.
27. Gaballa A, Newton GL, Antelmann H, Parsonage D, Upton H, Rawat M, et al. Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in *Bacilli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(14):6482-6486.
28. Paredes D, Ortiz C, Torres R. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Nanomedicine.* 2014;9:1717-1729.
29. Salomoni R, Léo P, Montemor AF, Rinaldi BG, Rodrigues M. Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnol Sci Appl.* 2017;10:115-121.
30. Kim SW, Jung JH, Lamsal K, Kim YS, Min JS, Lee YS. Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (NPsAg) against Various Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology.* 2012;40(1):53-8.
31. Lu L, Sun RW, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther.* 2008;13(2):253-262.
32. Gaikwad S, Ingle A, Gade A, Rai M, Falanga A, Incoronato N, et al. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:4303-4314.
33. Etemadzade M. Synthesis and evaluation of antiviral activities of novel sonochemical silver nanorods against HIV and HSV viruses. *Asian Pac J Trop Dis.* 2016; 6: 854-858.

34. Mori Y, Ono T, Miyahira Y, Nguyen VQ, Matsui T, Ishihara M. Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1):93.
35. Wong CK, Cheung PF, Ip WK, Lam CW. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37(1):85-96.
36. David L, Moldovan B, Vulcu A, Olenic L, Perde-Schrepler M, Fischer-Fodor E, et al. Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;122:767-777.
37. Kreve S, Oliveira VC, Bachmann L, Alves OL, Reis ACD. Influence of AgVO₃ incorporation on antimicrobial properties, hardness, softness and adhesion of a soft denture liner. *Sci Rep.* 2019;9(1):11889.
38. Khurshid Z, Zafar M, Qasim S, Shahab S, Naseem M, AbuReqaiba A. Advances in Nanotechnology for Restorative Dentistry. *Materials (Basel).* 2015;8(2):717-731.
39. Wei L, Lu J, Xu H, Patel A, Chen ZS, Chen G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov Today.* 2015;20(5):595-601.
40. Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MM. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:2399-2407.
41. Hegde NN, Attavar SH, Hegde MN, Priya G. Antibacterial activity of dental restorative material: An *in vitro* study. *J Conserv Dent.* 2018;21(1):42-46.
42. Kasraei S, Sami L, Hendi S, Alikhani MY, Rezaei-Soufi L, Khamverdi Z. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Restor Dent Endod.* 2014;39(2):109-114.
43. Dutra-Correa M, Leite AABV, de Cara SPM, Diniz IMA, Marques MM, Suffredini IB, et al. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. *J Dent.* 2018;77:66-71.
44. Mirhashemi A, Bahador A, Sodagar A, Pourhajibagher M, Amiri A, Gholamrezayi E. Evaluation of antimicrobial properties of nano-silver particles used in orthodontics fixed retainer composites: an experimental *in-vitro* study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2021;15(2):87-93.

45. Haghighoo R, Sadari H, Eskandari M, Haghsheenas H, Rezvani M. Evaluation of the antimicrobial effect of conventional and nanosilver-containing varnishes on oral streptococci. *J Dent (Shiraz)*. 2014;15(2):57-62.
46. Burgess JO, Vaghela PM. Silver Diamine Fluoride: A Successful Anticariogenic Solution with Limits. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):131-4.
47. Raura N, Garg A, Arora A, Roma M. Nanoparticle technology and its implications in endodontics: a review. *Biomater Res*. 2020;24(1):21.
48. Rodrigues CT, de Andrade FB, de Vasconcelos LRSM, Midena RZ, Pereira TC, Kuga MC, et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm and infected dentinal tubules. *Int Endod J*. 2018;51(8):901-911.
49. Afkhami F, Akbari S, Chiniforush N. *Enterococcus faecalis* Elimination in Root Canals Using Silver Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Diode Laser, or Laser-activated Nanoparticles: An *In Vitro* Study. *J Endod*. 2017;43(2):279-282.
50. Mishra P, Tyagi S. Surface analysis of gutta percha after disinfecting with sodium hypochlorite and silver nanoparticles by atomic force microscopy: An *in vitro* study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2018;15(4):242-247.
51. Haghighoo R, Ahmadvand M, Nyakan M, Jafari M. Antimicrobial Efficacy of Mixtures of Nanosilver and Zinc Oxide Eugenol against *Enterococcus faecalis*. *J Contemp Dent Pract*. 2017;18(3):177-181.
52. Vilela Teixeira AB, de Carvalho Honorato Silva C, Alves OL, Cândido Dos Reis A. Endodontic Sealers Modified with Silver Vanadate: Antibacterial, Compositional, and Setting Time Evaluation. *Biomed Res Int*. 2019;2019:4676354.
53. Teixeira ABV, de Castro DT, Schiavon MA, Dos Reis AC. Cytotoxicity and release ions of endodontic sealers incorporated with a silver and vanadium base nanomaterial. *Odontology*. 2020;108(4):661-668.
54. Baras BH, Melo MAS, Sun J, Oates TW, Weir MD, Xie X, et al. Novel endodontic sealer with dual strategies of dimethylaminohexadecyl methacrylate and nanoparticles of silver to inhibit root canal biofilms. *Dent Mater*. 2019;35(8):1117-1129.
55. Accardo C, Himel VT, Lallier TE. A novel GuttaFlow sealer supports cell survival and attachment. *J Endod*. 2014;40(2):231-234.

56. Panáček A, Smékalová M, Večeřová R, Bogdanová K, Röderová M, Kolář M, et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;142:392-399.
57. Prasetyo BS, Juwita R, Mahendra I, Halimah I, Widyasari E, Rusminah N, Mustika I. Evaluation of Silver Nanoparticles Addition in Periodontal Dressing For Wound Tissue Healing By 99mTc-ciprofloxacin. *J Young Pharm*. 2018; 10(1):17-20.
58. Shao J, Yu N, Kolwijck E, Wang B, Tan KW, Jansen JA, et al. Biological evaluation of silver nanoparticles incorporated into chitosan-based membranes. *Nanomedicine (Lond)*. 2017;12(22):2771-2785.
59. Lee DSJ, Moon JH, Kim J, Heo DN, Bang J, Lim HN, Kwon IK. Preparation of antibacterial chitosan membranes containing silver nanoparticles for dental barrier membrane applications. *J Ind Eng Chem*. 2018; 62: 196-202.
60. Bacali C, Baldea I, Moldovan M, Carpa R, Olteanu DE, Filip GA, et al. Flexural strength, biocompatibility, and antimicrobial activity of a polymethyl methacrylate denture resin enhanced with graphene and silver nanoparticles. *Clin Oral Investig*. 2020;24(8):2713-2725.
61. Gad MM, Abualsaud R, Rahoma A, Al-Thobity AM, Akhtar S, Fouda SM. Double-layered acrylic resin denture base with nanoparticle additions: An in vitro study. *J Prosthet Dent*. 2022;127(1):174-183.
62. Zhang Y, Chen YY, Huang L, Chai ZG, Shen LJ, Xiao YH. The antifungal effects and mechanical properties of silver bromide/cationic polymer nano-composite-modified Poly-methyl methacrylate-based dental resin. *Sci Rep*. 2017;7(1):1547.
63. Yoshihara K, Nagaoka N, Umeno A, Sonoda A, Obika H, Yoshida Y, et al. Antibacterial Effect of Amino Acid-Silver Complex Loaded Montmorillonite Incorporated in Dental Acrylic Resin. *Materials (Basel)*. 2021;14(6):1442.
64. Ginjupalli K, Alla RK, Tellapragada C, Gupta L, Upadhy Perampalli N. Antimicrobial activity and properties of irreversible hydrocolloid impression materials incorporated with silver nanoparticles. *J Prosthet Dent*. 2016;115(6):722-728.
65. Sobolev A, Valkov A, Kossenko A, Wolicki I, Zinigrad M, Borodianskiy K. Bioactive Coating on Ti Alloy with High Osseointegration and Antibacterial Ag Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(43):39534-39544.

66. Choi SH, Jang YS, Jang JH, Bae TS, Lee SJ, Lee MH. Enhanced antibacterial activity of titanium by surface modification with polydopamine and silver for dental implant application. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2019;17(3):2280800019847067.
67. Massa MA, Covarrubias C, Bittner M, Fuentevilla IA, Capetillo P, Von Marttens A, et al. Synthesis of new antibacterial composite coating for titanium based on highly ordered nanoporous silica and silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;45:146-153.
68. Györgyey Á, Janovák L, Ádám A, Kopniczky J, Tóth KL, Deák Á, et al. Investigation of the in vitro photocatalytic antibacterial activity of nanocrystalline TiO₂ and coupled TiO₂/Ag containing copolymer on the surface of medical grade titanium. *J Biomater Appl*. 2016;31(1):55-67.
69. Matsubara VH, Igai F, Tamaki R, Tortamano Neto P, Nakamae AE, Mori M. Use of Silver Nanoparticles Reduces Internal Contamination of External Hexagon Implants by *Candida albicans*. *Braz Dent J*. 2015;26(5):458-62.
70. Zhang Y, Zheng Z, Yu M, Hsu C, Berthiaume EA, Pan H, et al. Using an Engineered Galvanic Redox System to Generate Positive Surface Potentials that Promote Osteogenic Functions. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(18):15449-15460.
71. Liu X, Gan K, Liu H, Song X, Chen T, Liu C. Antibacterial properties of nano-silver coated PEEK prepared through magnetron sputtering. *Dent Mater*. 2017;33(9):e348-e60.
72. Yamada R, Nozaki K, Horiuchi N, Yamashita K, Nemoto R, Miura H, et al. Ag nanoparticle-coated zirconia for antibacterial prosthesis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;78:1054-1060.
73. Chen P, Wu Z, Leung A, Chen X, Landao-Bassonga E, Gao J, et al. Fabrication of a silver nanoparticle-coated collagen membrane with anti-bacterial and anti-inflammatory activities for guided bone regeneration. *Biomed Mater*. 2018;13(6):065014.
74. Selvido DI, Bhattarai BP, Riddhabhaya A, Vongsawan K, Arunpraphan S, Wongsirichat N. A Review on the Application of Silver Nanoparticles in Oral and Maxillofacial Surgery. *Eur J Dent*. 2021;15(4):782-7.
75. Canellas JVDS, Fraga SRG, Santoro MF, Netto JNS, Tinoco EMB. Intrasocket interventions to prevent alveolar osteitis after mandibular third molar surgery: A

systematic review and network meta-analysis. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020;48(9):902-913.

76. Dong Y, Liu W, Lei Y, Wu T, Zhang S, Guo Y, et al. Effect of gelatin sponge with colloid silver on bone healing in infected cranial defects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;70(Pt 1):371-377.

77. Baygar T, Sarac N, Ugur A, Karaca IR. Antimicrobial characteristics and biocompatibility of the surgical sutures coated with biosynthesized silver nanoparticles. *Bioorg Chem.* 2019;86:254-8.

78. De Simone S, Gallo AL, Paladini F, Sannino A, Pollini M. Development of silver nano-coatings on silk sutures as a novel approach against surgical infections. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(9):2205-2214.

79. Syukri DM, Nwabor OF, Singh S, Ontong JC, Wunnoo S, Paosen S, et al. Antibacterial-coated silk surgical sutures by ex situ deposition of silver nanoparticles synthesized with *Eucalyptus camaldulensis* eradicates infections. *J Microbiol Methods.* 2020;174:105955.

80. Zheng DW, Deng WW, Song WF, Wu CC, Liu J, Hong S, et al. Biomaterial-mediated modulation of oral microbiota synergizes with PD-1 blockade in mice with oral squamous cell carcinoma. *Nat Biomed Eng.* 2022;6(1):32-43.

81. Kazeminia M, Abdi A, Shohaimi S, Jalali R, Vaisi-Raygani A, Salari N, et al. Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: a systematic review and meta-analysis. *Head Face Med.* 2020;16(1):22.

82. Austin JH TH. Behavior of hypochlorite and of chloramine-T solutions in contact with necrotic and normal tissue in vivo. *J Exp Med;* 1918. 627–33.

83. Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in treatment of infected wounds. *Br Med J.* 1915; 2(2852): 318 –20.

84. Correr GM, Alonso RC, Grando MF, Borges AF, Puppim-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on primary dentin--a scanning electron microscopy (SEM) evaluation. *J Dent.* 2006;34(7):454-9.

85. Mohammed Hassan A, Ali Goda A, Baroudi K. The effect of different disinfecting agents on bond strength of resin composites. *Int J Dent.* 2014;2014:231235.

86. Siqueira JF. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998; 24(6): 414 - 6.
87. Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an *in vitro* study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(5):662-6.
88. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res.* 2007;86(1):90-4.
89. Puig Silla M, Montiel Company JM, Almerich Silla JM. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13(4):E257-260.
90. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J.* 1999;32(4):257-282.
91. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res.* 1977; 85(4): 255– 265.
92. Aviv S, Alin Y, Neta L, Yael H, Lada Z, Avia FN, et al. Elimination of *E. faecalis* with NaOCl versus chlorhexidine gluconate from primary molar root canal systems: an *ex vivo* model study. *Clin Oral Investig.* 2024;28(5):265.
93. Sabatini C, Pashley DH. Aging of adhesive interfaces treated with benzalkonium chloride and benzalkonium methacrylate. *Eur J Oral Sci.* 2015;123(2):102-107.
94. Turkun M, Ozata F, Uzer E, Ates M. Antimicrobial substantivity of cavity disinfectants. *Gen Dent.* 2005;53(3):182-186.
95. Sharma VK, Siskova KM, Zboril R, Gardea-Torresdey JL. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;204:15-34.
96. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. *J Dent Res.* 1993;72(5):931-8.
97. Svec TA, Harrison JW. The effect of effervescence on debridement of the apical regions of root canals in single-rooted teeth. *J Endod.* 1981;7(7):335-40.
98. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP). Opinion on hydrogen peroxide, in its free form or when released, in oral hygiene products and tooth whitening products. SCCP. 2007.

99. Alatta A, Nassar M, Gorduysus M, Alkhatib W, Sayed M. In Vitro Investigation of the Effects of Various Reducing Agents on Dentin Treated with Hydrogen Peroxide. *Polymers (Basel)*. 2024;16(11).
100. Coelho A, Amaro I, Rascão B, Marcelino I, Paula A, Saraiva J, et al. Effect of Cavity Disinfectants on Dentin Bond Strength and Clinical Success of Composite Restorations- A Systematic Review of In Vitro, In Situ and Clinical Studies. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).
101. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1457-65.
102. Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MA, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod*. 2015;40(3):195-201.
103. Abdelkafy H, Elsheikh HM, Kataia MM, Marzouk RM, Abdeltwab E, Atta A, et al. Efficacy of using chitosan and chitosan nanoparticles as final irrigating solutions on smear layer removal and mineral content of intraradicular dentin. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2023;41(2):170-177.
104. Costa EM, Silva S, Tavaría FK, Pintado MM. Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe*. 2013;20:27-31.
105. Xu X, Li JY, Zhou XD, Xie Q, Zhan L, Featherstone JD. Randomized controlled clinical trial on the evaluation of bacteriostatic and cariostatic effects of a novel povidone-iodine/fluoride foam in children with high caries risk. *Quintessence Int*. 2009;40(3):215-23.
106. Türkün M, Türkün LS, Kalender A. Effect of cavity disinfectants on the sealing ability of nonrinsing dentin-bonding resins. *Quintessence Int*. 2004;35(6):469-76.
107. Verma SK, Maheshwari S, Singh RK, Chaudhari PK. Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. *Natl J Maxillofac Surg*. 2012;3(2):124-32.
108. De Sousa Farias SS, Nemezio MA, Corona SA, Aires CP, Borsatto MC. Effects of low-level laser therapy combined with toluidine blue on polysaccharides and biofilm of *Streptococcus mutans*. *Lasers Med Sci*. 2016;31(5):1011-6.
109. Mohan PV, Uloopi KS, Vinay C, Rao RC. In vivo comparison of cavity disinfection efficacy with APF gel, Propolis, Diode Laser, and 2% chlorhexidine in primary teeth. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(1):45-50.

110. Saini R. Ozone therapy in dentistry: A strategic review. *J Nat Sci Biol Med.* 2011;2(2):151-3.
111. Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am J Dent.* 2004;17(1):56-60.
112. Güneş Ş, Bahsi E., İnce B., Çolak H., Dalli M., Yavuz İ., Cangül S. Comparative Evaluation of the Effects of Ozone, Diode Laser, and Traditional Cavity Disinfectants on Microleakage. *Ozone Sci Eng.* 2014; 36(2): 206–211.
113. Attur K, Joy MT, Karim R, Anil Kumar VJ, Deepika C, Ahmed H. Comparative analysis of endodontic smear layer removal efficacy of 17% ethylenediaminetetraacetic acid, 7% maleic acid, and 2% chlorhexidine using scanning electron microscope: An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6(Suppl 2):S160-5.
114. Dos Reis-Prado AH, Abreu LG, Fagundes RR, Oliveira SC, Bottino MC, Ribeiro-Sobrinho AP, et al. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on regenerative endodontics: A systematic review. *Int Endod J.* 2022;55(6):579-612.
115. Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Hoffer PC, et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2016;49(6):581-90.
116. Williams DF. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials. In: *Definitions in Biomaterials.* Amsterdam: Elsevier; 1987.
117. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008. 29(20): 2941–53.
118. McBride SH, Falls T, Knothe Tate ML. Modulation of stem cell shape and fate B: mechanical modulation of cell shape and gene expression. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(9):1573-80.
119. Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials.* 2014;35(38):10009-14.
120. Hosseinpour S, Gaudin A, Peters OA. A critical analysis of research methods and experimental models to study biocompatibility of endodontic materials. *Int Endod J.* 2022;55 Suppl 2(Suppl 2):346-69.
121. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(6):428-37.

122. Martínez E, Lagunas A, Mills CA, Rodríguez-Seguí S, Estévez M, Oberhansl S, et al. Stem cell differentiation by functionalized micro- and nanostructured surfaces. *Nanomedicine (Lond)*. 2009;4(1):65-82.
123. Medici S, Peana M, Nurchi VM, Zoroddu MA. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *J Med Chem*. 2019;62(13):5923-43.
124. Besinis A, De Peralta T, Handy RD. The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*. 2014;8(1):1-16.
125. Oncu A, Celikten B, Aydın B, Amasya G, Tuncay E, Eskiler GG, et al. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles, sodium hypochlorite, chlorhexidine, and hypochlorous acid on dentinal surfaces infected with *Enterococcus faecalis*. *Microsc Res Tech*. 2024;87(9):2094-102.
126. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*. 2014;40(2):285-90.
127. Martin ME, Reaves DK, Jeffcoat B, Enders JR, Costantini LM, Yeyeodu ST, et al. Silver nanoparticles alter epithelial basement membrane integrity, cell adhesion molecule expression, and TGF- β 1 secretion. *Nanomedicine*. 2019;21:102070.
128. Nasim I, Vishnupriya V, Jabin Z, Nathan S. Known data on the effectiveness of silver nano particles on root canal disinfection. *Bioinformation*. 2021;17(1):218-22.
129. Mahmoud A, Moussa S, El Backly R, El-Gendy R. Investigating the residual effect of silver nanoparticles gel as an intra-canal medicament on dental pulp stromal cells. *BMC Oral Health*. 2022;22(1):545.
130. Albashari AA, He Y, Albaadani MA, Xiang Y, Ali J, Hu F, et al. Titanium Nanotube Modified With Silver Cross-Linked Basic Fibroblast Growth Factor Improves Osteoblastic Activities of Dental Pulp Stem Cells and Antibacterial Effect. *Front Cell Dev Bio*. 2021;9:654
131. Sánchez MT, Yileng L. Effect of the addition of silver nanoparticles on the mechanical properties of an orthodontic adhesive. *Saudi Dent J*. 2023; 36(2):359-363.
132. Ameh T, Zarzosa K, Dickinson J, Braswell WE, Sayes CM. Nanoparticle surface stabilizing agents influence antibacterial action. *Front Microbiol*. 2023;14:1119550.

133. Afrasiabi S, Partoazar A. Targeting bacterial biofilm-related genes with nanoparticle-based strategies. *Front Microbiol.* 2024;15:1387114.
134. Swolana D, Kępa M, Kruszniewska-Rajs C, Wojtyczka RD. Antibiofilm Effect of Silver Nanoparticles in Changing the Biofilm-Related Gene Expression of *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Mol Sci.* 2022;23(16).
135. International Organization for Standardization. ISO 10993-1:2018 Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. Geneva: ISO; 2018.
136. International Organization for Standardization. ISO 10993-12:2009. *Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials*. Geneva: ISO; 2009.
137. International Organization for Standardization. ISO 10993-5. *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva: ISO; 2009.
138. Banerjee S, Loza K, Meyer-Zaika W, Prymak O, Epple M. Structural Evolution of Silver Nanoparticles during Wet-Chemical Synthesis. *Chem Mater*; 2014; 26(2): 951-957.
139. Mora A, García-Bernal D, Rodríguez-Lozano FJ, Ghilotti J, Lozano A, López-García S. Biocompatibility and osteogenic potential of novel tricalcium silicate-based materials in human dental pulp stem cells: Advancing vital pulp therapies. *Dent Mater.* 2025;41(6):644-57.
140. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol.* 2011;716:157-68.
141. Soares T, Rodrigues D, Sarraguça M, Rocha S, Lima JLFC, Ribeiro D, et al. Optimization of Experimental Settings for the Assessment of Reactive Oxygen Species Production by Human Blood. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:7198484.
142. Reddy H, Javvaji CK, Malali S, Kumar S, Acharya S, Toshniwal S. Navigating the Cytokine Storm: A Comprehensive Review of Chemokines and Cytokines in Sepsis. *Cureus.* 2024;16(2):e54275.
143. Oncu A, Huang Y, Amasya G, Sevimay FS, Orhan K, Celikten B. Silver nanoparticles in endodontics: recent developments and applications. *Restor Dent Endod.* 2021;46(3):e38.
144. Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2).

145. Fakeeha G, AlHarbi S, Auda S, Balto H. The Impact of Silver Nanoparticles' Size on Biofilm Eradication. *Int Dent J*. 2025;75(2):1213-22.
146. Sheikh S. TV. Effect of green synthesized silver nanoparticles on quorum sensing inhibition of UTI pathogens. *AsianJPharmClinRes* 2017;10(5):302.: *AsianJPharmClinRes*; 2017. p. 302.
147. Rozhin A, Batasheva S, Kruchkova M, Cherednichenko Y, Rozhina E, Fakhrullin R. Biogenic Silver Nanoparticles: Synthesis and Application as Antibacterial and Antifungal Agents. *Micromachines (Basel)*. 2021;12(12).
148. Guo X, Li Y, Yan J, Ingle T, Jones MY, Mei N, et al. Size- and coating-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using in vitro standard assays. *Nanotoxicology*. 2016;10(9):1373-84.
149. Butler KS, Peeler DJ, Casey BJ, Dair BJ, Elespuru RK. Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis*. 2015;30(4):577-91.
150. Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11:11.
151. Perde-Schrepler M, Florea A, Brie I, Virag P, Fischer-Fodor E, Vâlcău A, et al. Size-Dependent Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Cochlear Cells *In Vitro*. *Journal of Nanomaterials*; 2019. p. 12.
152. Souza TA, Franchi LP, Rosa LR, da Veiga MA, Takahashi CS. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016;795:70-83.
153. Lebedová J, Hedberg YS, Odnevall Wallinder I, Karlsson HL. Size-dependent genotoxicity of silver, gold and platinum nanoparticles studied using the mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis*. 2018;33(1):77-85.
154. Wang X, Ji Z, Chang CH, Zhang H, Wang M, Liao YP, et al. Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. *Small*. 2014;10(2):385-98.
155. Bakand S, Hayes A. Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).

156. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology letters*. 2008;176(1):1-12.
157. Pal S, Tak Y. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*. 2007:1712-20.
158. Li J, Zhang B, Chang X, Gan J, Li W, Niu S, et al. Silver nanoparticles modulate mitochondrial dynamics and biogenesis in HepG2 cells. *Environ Pollut*. 2020;256:113430.
159. Ferdous Z, Nemmar A. Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7).
160. Helmlinger J, Sengstock C, Groß-Heitfeld C, Mayer C, Schildhauer TA, Köller M, et al. Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects. *RSC Adv*.; 2016. p. 18490-501.
161. Jiang X, Foldbjerg R, Miclaus T, Wang L, Singh R, Hayashi Y, et al. Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicol Lett*. 2013;222(1):55-63.
162. Che B, Luo Q, Zhai B, Fan G, Liu Z, Cheng K, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosilver in stable GADD45 α promoter-driven luciferase reporter HepG2 and A549 cells. *Environ Toxicol*. 2017;32(9):2203-11.
163. Rodríguez-Garraus A, Azqueta A, Vettorazzi A, López de Cerain A. Genotoxicity of Silver Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(2).
164. Vuković B, Milić M, Dobrošević B, Ilić K, Pavičić I, Šerić V, et al. Surface Stabilization Affects Toxicity of Silver Nanoparticles in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(7).
165. Ahlberg S, Antonopulos A, Diendorf J, Dringen R, Eppele M, Flöck R, et al. PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014;5:1944-65.
166. Nallanthighal S, Chan C, Bharali DJ, Mousa SA, Vásquez E, Reliene R. Particle coatings but not silver ions mediate genotoxicity of ingested silver nanoparticles in a mouse model. *NanoImpact*. 2017;5:92-100.

167. Huynh KA, Chen KL. Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *Environ Sci Technol*. 2011;45(13):5564-71.
168. Bastos V, Duarte IF, Santos C, Oliveira H. Genotoxicity of citrate-coated silver nanoparticles to human keratinocytes assessed by the comet assay and cytokinesis blocked micronucleus assay. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(5):5039-48.
169. Ivask A, Voelcker NH, Seabrook SA, Hor M, Kirby JK, Fenech M, et al. DNA melting and genotoxicity induced by silver nanoparticles and graphene. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(5):1023-35.
170. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015;20(5):8856-74.
171. Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):7202.
172. Wang X, Li T, Su X, Li J, Li W, Gan J, et al. Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver HepG2 cells and in mice. *J Appl Toxicol*. 2019;39(6):908-918.
173. El Badawy AM, Silva RG, Morris B, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ Sci Technol*. 2011;45(1):283-287.
174. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano*. 2010;4(11):6903-6913.
175. Fraser JA, Kemp S, Young L, Ross M, Prach M, Hutchison GR, et al. Silver nanoparticles promote the emergence of heterogeneous human neutrophil sub-populations. *Sci Rep*. 2018;8(1):7506.
176. Halkai KR, Mudda JA, Shivanna V, Patil V, Rathod V, Halkai R. Cytotoxicity evaluation of fungal-derived silver nanoparticles on human gingival fibroblast cell line: *An. J Conserv Dent*. 2019;22(2):160-163.
177. Laredo-Naranjo MA, Carrillo-Gonzalez R, De La Garza-Ramos MA, Garza-Navarro MA, Torre-Martinez HHH, Del Angel-Mosqueda C, et al. Antimicrobial properties and dental pulp stem cell cytotoxicity using carboxymethyl cellulose-silver nanoparticles deposited on titanium plates. *Acta Biomater Odontol Scand*. 2016;2(1):60-67.

178. Zorraquín-Peña I, Cueva C, González de Llano D, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Glutathione-Stabilized Silver Nanoparticles: Antibacterial Activity against Periodontal Bacteria, and Cytotoxicity and Inflammatory Response in Oral Cells. *Biomedicines*. 2020;8(10):375.
179. Paknejadi M. BM, Salimi M., Razavi V. Concentration- and Time-Dependent Cytotoxicity of Silver Nanoparticles on Normal Human Skin Fibroblast Cell Line. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. In Press. 2018; 20(10): 1-8.
180. Fu J, Meng K, Yuan Q. Effect of Osteogenic Metabolic Differentiation of Silver Nanoparticles-based Periodontal Ligament Fibroblasts on Orthodontic Tooth Movement. *Cell Biochem Biophys*. 2025;83(2):1713-1723.
181. Watanabe K, Kim KH, Menzel D, Freund HJ. Hyperthermal chaotic photodesorption of xenon from alumina-supported silver nanoparticles: plasmonic coupling and plasmon-induced desorption. *Phys Rev Lett*. 2007;99(22):225501.
182. Vieira LFA, Lins MP, Viana I, Dos Santos JE, Smaniotto S, Reis M. Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblasts in vitro. *Nanoscale Res Lett*. 2017;12(1):200.
183. Agnihotri S, Mukherji S. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale*. 2013;5(16):7328-7340.
184. Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Lee KJ, Vaidyanathan R, Eom SH, Gurunathan S. The inhibition of advanced glycation end-products-induced retinal vascular permeability by silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(8):2260-71.
185. Sooklert K, Wongjarupong A, Cherdchom S, Wongjarupong N, Jindatip D, Phungnoi Y, et al. Molecular and Morphological Evidence of Hepatotoxicity after Silver Nanoparticle Exposure: A Systematic Review,. *Toxicol Res*. 2019;35(3):257-270.
186. Xiong H, Nie X, Cao W, Zhu J, Chen J, Liu R, et al. Investigation of mitochondria-dependent apoptosis pathway and lipid peroxidation level induced by biosynthesized silver nanoparticles: caspase-3 activation, BAK1/BCLx regulation and malondialdehyde production. *Cancer Nano*. 2024; 15: 13.
187. Youssef MM, El-Mansy MN, El-Borady OM, Hegazy EM. Impact of biosynthesized silver nanoparticles cytotoxicity on dental pulp of albino rats (histological and immunohistochemical study). *J Oral Biol Craniofac Res*. 2021;11(3):386-92.

188. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int*. 2013;2013:942916.
189. Steckiewicz KP, Dmochowska M, Megiel E, Barcińska E, Inkielewicz-Stępnia I. Functionalization-Dependent Cytotoxicity of Silver Nanoparticles: A Comparative Study of Chlorhexidine and Metronidazole Conjugates. *Biomolecules*. 2025;15(6): 850.
190. Sun J, Wan J, Zhai X, Wang J, Liu Z, Tian H, et al. Silver nanoparticles: Correlating particle size and ionic Ag release with cytotoxicity, genotoxicity, and inflammatory responses in human cell lines. *Toxicol Ind Health*. 2021;37(4):198-209.
191. Nia AF, Ataei M, Zeighami H. A comparative study on the antimicrobial activity of irreversible hydrocolloid mixed with silver nanoparticles and chlorhexidine. *Dent Res J (Isfahan)*. 2020;17(2):120-125.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Informe del Comité de Bioseguridad en experimentación.

UNIVERSIDAD DE MURCIA VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN	
INFORME DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA	
Lucía Periago García, Jefa de Sección de Recursos Humanos de Investigación y del Plan Propio y Secretaria del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia.	
CERTIFICA:	
Que D.ª Ángeles Manzanera Mondéjar presentó la memoria de la Tesis Doctoral titulada <i>"Análisis de la citotoxicidad/biocompatibilidad de las partículas de plata frente a diferentes tejidos/cultivos celulares"</i>, dirigida por D.ª Julia Guerrero Gironés, al Comité de Bioseguridad en Experimentación.	
Que dicho Comité analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el veintisiete de febrero de dos mil veinticinco¹, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la bioseguridad en la investigación.	
Le comunicamos que, cuando se incorpore nuevo personal a la investigación, el Investigador Principal es el responsable de que reciba la formación adecuada y de que conozca las condiciones de funcionamiento correspondiente de las instalaciones. Deberá comunicar al Comité cualquier modificación al respecto.	
Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno de la Presidenta del Comité.	
VºBº LA PRESIDENTA DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN Senena Corbalán García	
ID: 654/2025	
¹ A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación.	
Comisión de Ética de Investigación Vicerrectorado de Investigación Edificio ESUM, 3ª planta Campus de Espinardo 30071 — Murcia ESPAÑA	comision.etica.investigacion@um.es TEL: 868 88 3614/9896/9899 www.um.es/web/vic-investigacion/  HR EXCELLENCE IN RESEARCH 
	Código seguro de verificación: RUxFMn7h-Mplc07Zk-X3YbJTy-PhRRk+e0 COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.1 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

ANEXO 2. Informe de evaluación de la Comisión de Ética de Investigación.

UNIVERSIDAD
DE MURCIA

VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

Informe de evaluación Comisión de Ética de Investigación (CEI)

Jaime Miguel Peris Riera, como secretario de la Comisión de Ética de Investigación

CERTIFICA

Que esta Comisión de Ética de Investigación, ha evaluado la propuesta de la investigadora Angeles Manzanera Mondejar, M10/2024/176, para la realización de la tesis doctoral: "Análisis de la citotoxicidad/biocompatibilidad de las partículas de plata frente a diferentes tejidos/cultivos celulares".

Y considerando que,

1. La investigación está justificada porque sus objetivos permitirán generar un aumento del conocimiento y un beneficio para la sociedad que hace asumibles las molestias y riesgos previsibles.
2. La capacidad del equipo investigador y los recursos disponibles son los adecuados para realizarla.
3. Se plantea según los requisitos metodológicos y éticos necesarios para su ejecución, según los criterios de buenas prácticas de la investigación científica.
4. Se cumple la normativa vigente, incluidas las autorizaciones, acuerdos o convenios necesarios para llevarla a cabo.

Ha emitido en la reunión celebrada el viernes 21 de febrero de 2025 (ACTA16/2025/CEI), **INFORME FAVORABLE** a que dicha tesis doctoral sea realizada por el equipo investigador:

Julia Guerrero Girones

Francisco Javier Rodriguez Lozano (Director de la tesis doctoral)

Angeles Manzanera Mondejar

Sergio Lopez Garcia

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto

Comisión de Ética de Investigación
Vicerrectorado de Investigación
Edificio ESUM, 3ª planta
Campus de Espinardo
30071 - Murcia
ESPAÑA

comision.etica.investigacion@um.es
TEL: 968 88 360.4 / 968 98 989
www.um.es/web/vic-investigacion/



HE FICHA I PROF IN INVESTIGACI



1 de 2



Código seguro de verificación: RUxPMu8O-X2bkVPQJ-rtr2y0u+-T4ZcDEqW

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 2

Nota: es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.1 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

UNIVERSIDAD
DE MURCIA

VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

bueno de la presidenta de la Comisión de Ética de Investigación



Comisión de Ética de Investigación
Vicerrectorado de Investigación
Edificio ESIUM, 3ª planta
Campus de Espinardo
30101 Murcia
ESPAÑA

comision.etica.investigacion@um.es
TEL: 968 88 3414-9688 9689
www.um.es/vic-investigacion/



RECTORADO DE INVESTIGACIÓN



2 de 2



Código seguro de verificación: RUxPMu80-X2bkVPQJ-rtr2y0u+-T4ZcDEgW

COPIA ELECTRÓNICA - Página 2 de 2

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.1 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <http://sede.um.es/validador/>

ANEXO 3. Declaración de consentimiento informado para pacientes.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D., y con DNI nº y Doña,
con DNI nº como tutores de,
menor de edad, manifiestan que han sido informados sobre los beneficios que podría
suponer la extracción y donación de un diente deciduo para cubrir los objetivos del
Proyecto de Investigación titulado “ANÁLISIS DE LA
CITOTOXICIDAD/BIOCOMPATIBILIDAD DE LAS PARTÍCULAS DE PLATA
FRENTE A DIFERENTES TEJIDOS/CULTIVOS CELULARES”, dirigido por D.
Francisco Javier Rodríguez Lozano, teléfono de contacto: 609406624 y correo
electrónico: fcojavier@um.es, con el fin de mejorar los tratamientos de regeneración o
reparación en dientes con la pulpa afectada.

He sido informado/a de las pruebas que van a ser realizadas pretenden determinar la
biocompatibilidad de las nanopartículas de plata con células madre de dientes
permanentes.

He sido informado de que los datos y la información que se recojan y traten durante la
investigación serán disociados.

He sido también informado de que puedo abandonar en cualquier momento mi
participación en el estudio sin dar explicaciones y sin que ello me suponga perjuicio
alguno.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a esta extracción y
donación y a que sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

XXX, a XX de XXXXX de 20XX.

Fdo. D/Dña.

ANEXO 4. Hoja de información a la persona participante.

HOJA DE INFORMACIÓN A LA PERSONA PARTICIPANTE

Sobre el proyecto “ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD/BIOCOMPATIBILIDAD DE LAS PARTÍCULAS DE PLATA FRENTE A DIFERENTES TEJIDOS/CULTIVOS CELULARES”

Estimado Sr. o Sra.:

Le invitamos a participar en un estudio de investigación sobre CITOTOXICIDAD.

Objetivos

El estudio “ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD/BIOCOMPATIBILIDAD DE LAS PARTÍCULAS DE PLATA FRENTE A DIFERENTES TEJIDOS/CULTIVOS CELULARES” pretende determinar la biocompatibilidad de dos muestras diferentes de nanopartículas de plata con células madre de dientes permanentes.

Datos de los investigadores

Ante cualquier duda o renuncia que pueda surgir en relación con su participación en la presente investigación, pueden dirigirse a la persona responsable de la misma, cuyos datos son los siguientes:

- Nombre: Ángeles Manzanera Mondéjar
- Cargo: Doctorando
- Dirección de contacto: C/ Churruca 9, 1ªA
- Correo electrónico: angelesmanzaneram@gmail.com
- Teléfono de contacto: 652431913

Uso confidencial de los datos:

Los datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que estará sometido a y con las garantías de la ley 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos personales.

Derecho de la persona a retirarse del estudio

Puede abandonar en cualquier momento su participación en el estudio sin tener que dar explicaciones y sin que ello suponga perjuicio alguno.

En consecuencia, le solicitamos que firme y entregue la hoja de consentimiento informado que se adjunta.

En Murcia, a de de 202_

En nombre del equipo investigador

El interesado,

Fdo. Ángeles Manzanera Mondéjar

Fdo.

ANEXO 5. Documento especificaciones de NPsAg MG-85



Sample: MG-85 (Silver nanoparticles with a polyethylenimine coat) dispersed in water

Solvent: Milli-Q water

Date: 19/09/2023

Sample quantity: 10.0 mL

Characteristics:

Color: Caramel Brown

-Concentrations determined by TermoGravimetric Analysis (TGA)

Total Solids Content: 112.7 g/L (Ag@PEI)

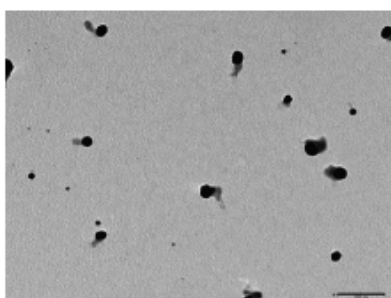
Total Silver Content in the simple: 26.20 g/L (Ag)

Total PEI Content in the simple: 86.50 g/L (PEI)

-Mean size determined by Transmission Electron Microscopy (nm):

Size Ag NPs: 18.83±8.86

TEM Image



ANEXO 6. Documento especificaciones de NPsAg MG-89



Sample: MG-89 (Silver nanoparticles with a polyethylenimine coat) dispersed in water

Solvent: Milli-Q water

Date: 19/09/2023

Sample quantity: 10.0 mL

Characteristics:

Color: Caramel Brown

-Concentrations determined by TermoGravimetric Analysis (TGA)

Total Solids Content: 99.3 g/L (Ag@PEI)

Total Silver Content in the simple: 16 g/L (Ag)

Total PEI Content in the simple: 83.3 g/L (PEI)

-Mean size determined by Transmission Electron Microscopy (nm):

Size Ag NPs: 3.67 ± 1.06

TEM Image

